Beeinflussung des Wachstums von *Aspergillus niger v. Tiegh.* durch die Koordinationssphäre und den Oxydationszustand des Molybdäns

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Basel

von
Lucia Graf
aus Basel

1971

Druck: Rerodruck R. Rotach, CH-8620 Wetzikon ZH – 1972

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren

Dr. M. Geiger-Huber
Dr. S. Fallab

Basel, den 9. März 1971

Prof. Dr. *H.P. Laubscher*
Dekan

Separatabdruck aus „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft"
Band 82, 1972
(Ausgegeben am 31. Juli 1972)

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *82* (2), 113–152 (1972)

Beeinflussung des Wachstums von *Aspergillus niger v. Tiegh.* durch die Koordinationssphäre und den Oxydationszustand des Molybdäns

von Lucia Graf

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Manuskript eingegangen am 21. September 1971

Inhalt

Einleitung 114
Problemstellung 114
Methoden 116
Versuchsorganismus 116
Reinigung der Glaswaren 119
Entfernung von Schwermetallverunreinigungen aus der Stammlösung der Makroelemente 120
Stammlösungen zur Herstellung der Nährlösung 122
Durchführung des Versuchs 123
Vorversuche 124
Hauptversuche 134
Diskussion 143
Zusammenfassung 149
Literatur 150

Einleitung

Die Bedeutung des Molybdäns im Stoffwechsel von Pflanzen der verschiedensten Organisationsstufen, vor allem seine Bedeutung im Stickstoffhaushalt, wurde schon um 1930 (Bortels 1930) erkannt. Zunächst konnte in den Arbeiten von Steinberg, Arnon, Stout und Arnon und Mulder (ausführliche Bibliographie in Hewitt 1959 und Steward F.C. 1963) auf die wichtige Rolle des Molybdäns bei der Reduktion von Nitrat durch das Enzym Nitratreduktase hingewiesen und gezeigt werden, dass Molybdän nach den von Arnon (1950) aufgestellten Kriterien, als essentielles Mikroelement betrachtet werden darf. Der Wirkungsmechanismus des Molybdäns bei der Nitratreduktion wurde vor allem durch Nicholas in vitro an Enzympräparaten von *Neurospora* untersucht, und als wirksame Oxidationsstufe Mo^{5+} postuliert (Nicholas und Stevens 1955). Ferner wies Nicholas bald auf die Identität von Nitrat – und Cytochrom-c – Reduktase, sowie auf die, ausser in der letzten Sequenz der Elektronen-Übertragung, bestehende Übereinstimmung assimilatorischer und dissimilatorischer Nitratreduktase-Systeme bei Pilzen hin (Nicholas D.J.D. in Ainsworth/Sussman 1965). In neuester Zeit ist die Bedeutung des Molybdäns auch bei der Stickstoffbindung nitrifizierender Mikroorganismen eindeutig gezeigt, und möglicherweise beteiligte Enzymsysteme sind ausführlich beschrieben worden (Wallace W. und Nicholas 1968 und 1969, Aleem 1970). Gleichzeitig mit den Untersuchungen an Kohlenstoff – heterotrophen Mikroorganismen wie *Neurospora* und *Aspergillus,* wurde auch der Molybdänanspruch verschiedener Grün- und Blaualgen *(Chlorella, Scenedesmus, Ankistrodesmus* und *Anabaena)* bestätigt, und die Aktivität der Nitratreduktase in Abhängigkeit von der Photosynthese geprüft (Hutner und Provasoli 1964, dort weitere Literatur). Komplizierter liegen die Verhältnisse in bezug auf die Wirkung des Molybdäns und der Enzymsysteme des Stickstoffhaushaltes bei den höheren Pflanzen (Kessler 1964). Neuere Beiträge zum Verständnis dieser Probleme wurden an einem Symposium in Long Ashton, Bristol 1967 geliefert (Hewitt und Cutting Eds. 1968).

Problemstellung

Der Erfolg der frühesten Arbeiten über die Wirkung des Molybdäns als Spurenelement hing wesentlich davon ab, dass *Aspergillus niger v. Tieghem* als Versuchsorganismus gewählt worden war. Bestimmte Stämme von *Aspergillus niger* zeigen eine ausserordentlich grosse Empfindlichkeit für Molybdän in sehr tiefen Konzentrationsbereichen, die sich in einer spezifischen und quantitativen Reaktion bei stufenweiser Änderung der Molybdänkonzentration von ungenügender bis zu optimaler Höhe, ausdrückt. Auf Grund dieser Eigenschaften konnten von Steinberg 1935, Mulder 1939, Nicholas u. Fielding 1950 und Hewitt u. Hallas 1951, Arbeitsmethoden für einen biologischen Test zur Bestimmung von Molybdän durch *Aspergillus niger* entwickelt werden, der mit seiner Nachweisgrenze von ungefähr $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ µg Molybdän bis heute den meisten chemischen Nachweisverfahren überlegen ist. In der vorliegenden Arbeit

UNIV. LEIDEN BIBL.

wurde diese empfindliche Reaktion des Mycelwachstums von *Aspergillus niger* auf unterschiedliches Angebot von Molybdän in einer für die Enzymaktivität wirksamen Form, als Methode zur Lösung verschiedener Fragen über diese wirksame Form benützt.

Aus einer Durchsicht der Literatur geht hervor, dass in allen Untersuchungen zur Wirkung des Molybdäns auf das Wachstum von *Aspergillus niger* und anderer Mikroorganismen, Molybdän immer in Form von **Natriummolybdat** oder MoO_3, also immer in der Oxidationsstufe VI der Nährlösung zugegeben wurde. Offenbar ist in vivo die Wirksamkeit anderer Oxydationsstufen bisher nicht geprüft worden. Ausserdem wird als geeigneter pH-Bereich für die Durchführung des *Aspergillus niger*-Testes zur Bestimmung von Molybdän, ein pH-Wert um 2 bezeichnet (Nicholas 1952, Koch und Koch-Dedic 1964). Nach diesen Angaben sollen tiefe pH-Werte die Empfindlichkeit des Pilzes auf unterschiedliche Molybdänkonzentrationen steigern. Diese hohe H^+-Ionenkonzentration beeinflusst jedoch den Kondensationsgrad der Molybdationen entscheidend, liegen die Molybdate in schwach saurem und saurem Milieu doch in Form von *Isopolysäuren*, beziehungsweise von negativ geladenen Polysäuren-Anionen von hohem Molekulargewicht, z.B. $Mo_7O_{24}^{6-}$ oder $Mo_8O_{26}^{4-}$, also als Anionen von ziemlicher Grösse vor. Es stellt sich daher zunächst die Frage nach der **Aufnahme** solcher grosser Ionen durch die Plasmagrenzschichten des Mycels überhaupt, d.h. nach dem Ort, an welchem Molybdän aus dem ursprünglichen Verband frei wird, um in den eigentlichen biochemischen Metabolismus in der Zelle eintreten zu können. Durch eine Veränderung der Koordinationssphäre des Molybdäns, so dass komplex gebundene Molybdän-Anionen von ähnlicher Grösse und ähnlichem Ladungszustand wie die Polysäuren-Anionen des Molybdates vorliegen, und durch den Vergleich zwischen der Wirkung auf das Wachstum von *Aspergillus niger* durch solche Molybdän-Chelate einerseits, und von Kondensaten des Molybdates andererseits, soll ein Hinweis zur Klärung dieser Frage erlangt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden **Molybdän-Aethylendiamintetraessigsäure-(Mo-EDTA) Chelate** zur Untersuchung gewählt, weil sie relativ stabil, und in bezug auf die chemische Darstellung leicht zugänglich sind. EDTA ist ein in bezug auf den Pflanzenstoffwechsel häufig untersuchter Komplexbildner. Über den Einfluss von EDTA, vor allem auf die Aufnahme von Eisen, Zink und Calcium, sowie auf Längenwachstum und Blühverhalten bei höheren Pflanzen, liegen in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor (Burström 1963, Stewart I. 1963, Hill-Cottingham und Lloyd-Jones 1965, Maheshwari und Seth 1966, Wallace A. 1966). In diesem Zusammenhang schien die Wahl von EDTA als Komplexbildner bei der Untersuchung der Wirkung von Molybdänchelaten interessant.

Das konkrete Ziel der Arbeit war die quantitative Untersuchung des Wachstums von *Aspergillus niger* in Abhängigkeit von der Zeit und der Molybdänkonzentration in Gegenwart von:

a) **Polymolybdat** b) **Mo^{VI}-EDTA** c) **Mo^{V}-EDTA** d) **Mo^{III}-EDTA**

Die Untersuchungen sollen zeigen, in welcher Weise **Oxydationsstufe** und **Kondensationsgrad** beziehungsweise **Koordinationssphäre** des essentiellen Spurenelementes Molybdän, Aufnahme und Wachstum beeinflussen.

Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Durchführung der Versuche zur Messung des Wachstums von *Aspergillus niger* in Abhängigkeit von der Molybdänquelle, die Arbeitsmethoden die Hewitt (Hewitt E.J. 1966 Kapitel 22.1, 22.4, 23.4) für den Test zur Bestimmung von Molybdän durch *Aspergillus niger* beschreibt, zum Teil leicht modifiziert (Koch O.G./ Koch-Dedic G.A. 1964), angewendet.

Als Mass für das Mycelwachstum wurde das Myceltrockengewicht aus Deckenkulturen im stehenden Kolben bestimmt. Es wurde dabei in Pyrex-Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 500 ml, die je 50 ml Versuchslösung enthielten, gearbeitet. Die Kolben wurden mit Pyrex-Bechergläsern (Volumen 100 ml) und einem Wattering zwischen Kolbenhals und Becherglaswand so verschlossen, dass das Becherglas nicht auf der Kolbenöffnung aufliegt.

Die in den Tabellen und Figuren angegebenen Mittelwerte wurden nach Hewitt 1966 aus drei Einzelwerten (je drei Kolben) gewonnen, wenn nichts anderes angegeben ist. Die Streuung der Einzelwerte wurde in der eigenen Versuchanordnung noch einmal geprüft. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum als Myceltrockengewicht, bei optimaler Molybdänkonzentration (0.01 µg Mo/Kolben) nach 5.5 Tagen Kulturdauer, aus 15 Kolben bestimmt. Dabei betrug der relative zufällige Fehler, das heisst die Varianz V 5,7%, so dass in der Folge die geringe Stichprobenzahl von 3 erlaubt schien. Die Varianz V wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{s * 100}{\bar{x}} \%$$ s = Standard-Abweichung

In den als „Hauptversuche" bezeichneten Versuchsserien, wurden alle Glasgeräte zur Entfernung von Metallspuren nach den auf Seite 119 beschriebenen Methoden gereinigt. Die für die Stammlösung der Makroelemente verwendeten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität verwendet, und diese Stammlösung ausserdem nach dem auf Seite 120 beschriebenen Verfahren zusätzlich gereinigt. Die Stammlösung der Mikroelemente und alle Hilfslösungen, die keinem Reinigungsverfahren unterworfen werden konnten, wurden aus spektralreinen Substanzen hergestellt.

Das Wasser, das zur Spülung der hochgereinigten Glasgeräte und zur Herstellung der Lösungen benützt wurde, wurde nach Voll-Entsalzung durch einen Ionenaustauscher (Kunstharz, Polystyrol-Basis, stark sauer-stark basisch) zweimal aus Quarz destilliert (Quarzbidestillierapparatur, Heraeus Bi 16), und wird im folgenden als „H_2O bidest" bezeichnet.

Versuchsorganismus

In der vorliegenden Arbeit wurde folgender Stamm von *Aspergillus niger* verwendet: *Aspergillus niger van Tieghem (Mulder strain) CBS 121.49* bezogen aus dem „Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" in Baarn, Holland.

Die Stammkulturen wurden zur Erhaltung abwechslungweise auf *Bierwürze-Agar* und *Czapek-Agar* auf Schrägagar-Röhrchen zu je 10 ml Nährboden kultiviert, und alle zwei Monate überimpft. Die Anzucht erfolgte jeweils bei 25°C – 27° C während 4–5 Tagen, worauf die Kulturer bei 15°C im Dunkeln gehalten wurden.

Bierwürze-Agar: ca. 125 ml Bierwürze-Extrakt und 875 ml Leitungswasser (Zuckergehalt ca. 2%), 2% Agar zufügen (20 g Agar pro Liter). Mit KOH 2N vor der Sterilisation auf ca. pH 7 einstellen. Sterilisation im Autoklaven bei 1 Atü, 120°C, während 20 Minuten.

Czapek-Agar: K_2HPO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KC1 0.5 g, $FeSO_4$ 0,01 g, $NaNO_3$ 2.0 g, Saccharose 30 g (= 3%), Agar 30 g (=1.5%), H_2O 1000 ml, pH des Agars ca. 6. Sterilisation im Autoklaven bei 1 Atü, 120°C, während 20 Minuten.

Vorkultur von Aspergillus niger zum Versuch

Zur Gewinnung der Sporensuspension zur Beimpfung der Versuchskolben wurde *A. niger* unmittelbar vor jeder Versuchsserie auf einem Malz-Agar nach Hewitt (Hewitt 1966 p. 456)

zweimal vorkultiviert. **Vorkultur 1:** Aus einer Stammkultur auf Bierwürze-Agar wurde auf einige *Hewitt-Malz-Agar* Röhrchen überimpft, und während 6 Tagen bei 25°C–27°C kultiviert. **Vorkultur 2:** Anschliessend wurde aus Vorkultur 1 in 20 *Hewitt-Malz-Agar* Röhrchen überimpft und während 7 Tagen bei 25°C–27°C kultiviert. Aus den Röhrchen aus Vorkultur 2 wurde innerhalb eines Tages die Sporensuspension gewonnen.

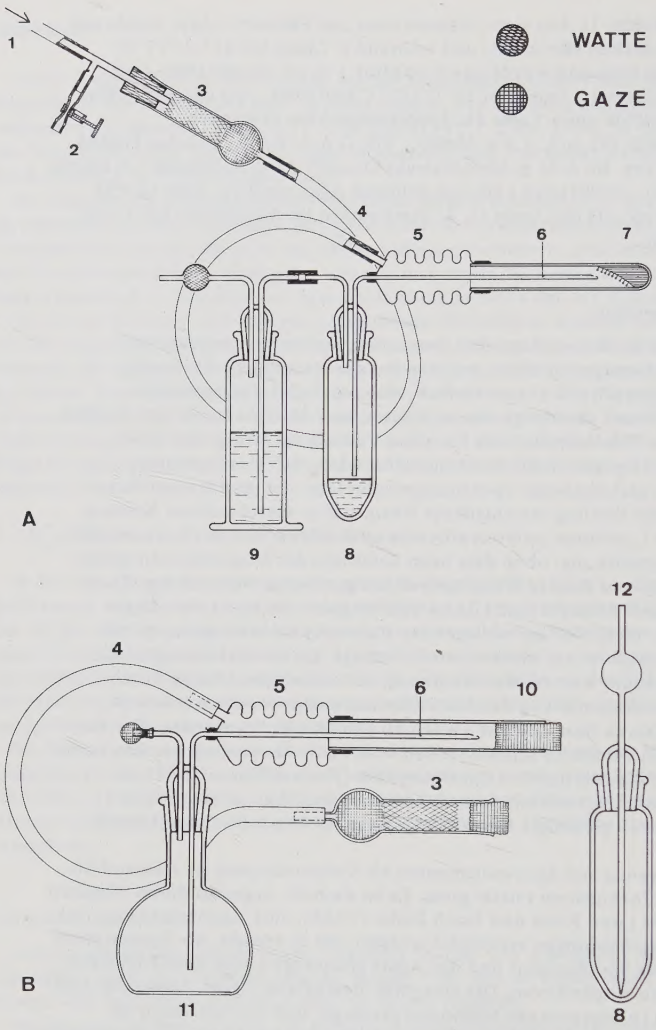
Malz-Agar nach Hewitt: KH_2PO_4 p.A. 1.2 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ p.A. 0.6 g, Proteose-Pepton Oxoid 0.6 g, Maltose krist. Erg. B6 6.25 g, Malz-Extrakt Oxoid 7.25 g. Substanzen in einem Teil H_2O unter kochen lösen, abfiltrieren und zum gelösten Agar zugeben. Agar (2.5%) 12.5 g, H_2O (entsalzt) 500 ml, pH des Agars ca. 5. Sterilisation im Autoklaven bei 1 Atü, 120°C während 20 Minuten.

Herstellung der Sporensuspension

Die Sporensuspension, die in den vorliegenden Versuchen verwendet werden sollte, musste verschiedene Anforderungen erfüllen, welchen bei der Herstellung Rechnung getragen werden musste. Einerseits ist es unerlässlich, eine möglichst gleichmässige Suspension zu verwenden, damit die Menge des Impfgutes, also die Sporenzahl pro Kolben, innerhalb eines bestimmten Toleranzbereiches für jeden Versuchskolben gleich bleibt. Andererseits soll durch das Impfgut möglichst wenig Molybdän als Verunreinigung eingeschleppt werden. Eine gleichmässige Sporensuspension lässt sich nur in einer Netzmittellösung erzielen. Bei der Prüfung verschiedener Nezmittel in verschiedenen Konzentrationen, zeigte Tween-80 („sorbitan polyoxyethylene monoöleate") in 0.1% wässeriger Lösung die beste Benetzungswirkung, ohne dass beim Schütteln der Suspension zu grosse Schaumbildung auftritt. Obwohl direkte Wirkungen derartiger Netzmittel auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen bekannt sind (Reese und Maguire 1969), ist eine Beeinflussung von *A. niger* durch Tween-80 im vorliegenden Fall nicht zu befürchten, da die Konzentration im Versuchskolben nur noch 0.0004% beträgt. Da der Reinheitsgrad des käuflichen Tween-80 unbekannt war, ist eine Reinigung der wässerigen Lösung durch CuS-Fällung, wie sie für die Stammlösung der Makroelemente angewendet worden ist, versucht worden. Das Verfahren lässt sich auf Tween-80 jedoch nicht anwenden. Die Verunreinigung an Molybdän in Tween-80 scheint jedoch weit unter der chemischen Nachweisgrenze, jedenfalls für den Nachweis durch Atomabsorption (Hoover/Duren 1967) zu liegen. Die Vorsichtsmassnahmen konnten deshalb nur darin bestehen, dass aus Quarz bidestilliertes Wasser und hoch gereinigte Pyrex-Glasgefässe zur Herstellung der Lösung verwendet wurden.

Die Gefahr der Einschleppung von Spurenelementen als Verunreinigung ist während der Sporenernte aus den Agar-Vorkulturen relativ gross. Es ist deshalb, angeregt durch Angaben bei Hewitt und Hallas (1951) und Koch und Koch-Dedic (1964), eine Apparatur (Fig. 1A) aus Pyrex-Glas mit Schliffverbindungen verwendet worden, die es erlaubt, die Sporen steril und ohne jede Berührung des Sporenrasens und des Agars abzusaugen, und direkt im sterilisierten Suspensionsmittel zu suspendieren. Die einzelnen Bestanteile dieser Apparatur sind jeweils nach den auf Seite 119 angegebenen Methoden gereinigt, und vor Gebrauch im Autoklaven sterilisiert worden. Figur 1B zeigt die Anordnung der Apparatur zur Sterilisation. Das Absaugrohr (6) befindet sich dabei in einem leeren Haltegefäss, damit es anschliessend an den Sterilisationsvorgang getrocknet werden kann, um das Ankleben der Sporen im Innern des Rohres zu vermindern. Die Impfpipette (12) wird ebenfalls in einem leeren Haltegefäss sterilisiert. Der zum Auffangen der Sporen während des Absaugens bestimmte Teil der Tween-80-Lösung wird im Suspensionsgefäss (8), und der Rest der Lösung in einem Vorratsgefäss separat sterilisiert. Das untere Ende des Absaugrohres darf während der Sporenernte nicht in die Tween-Lösung eintauchen, weil sonst Schaum entsteht und die Sporensuspension durch das Ausführrohr verloren geht. Nach beendetem Absaugvorgang werden Sporensuspension und sterile Tweenlösung im Suspensionsgefäss zum Endvolumen von 25 ml vereinigt.

Nach Koch (Koch und Koch-Dedic 1964) soll der Einfluss der Sporenzahl auf das Mycelwachstum im Intervall von 3.10^6 bis 10.10^6 Sporen pro Kolben (50 ml Versuchslösung enthaltend) vernachlässigbar sein. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Sporendichte von 5.10^6 Sporen pro Kolben angestrebt. Die Sporensuspension wurde jeweils in einer



Figur 1:

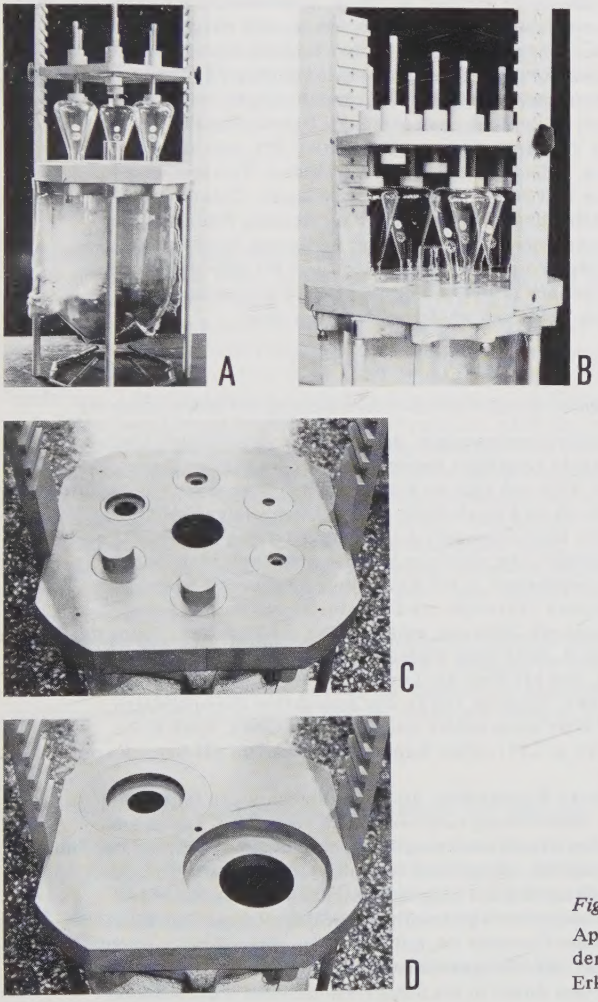
A Apparatur zur Herstellung der Sporensuspension.
B Anordnung der Apparatur zur Sterilisation;
Impfpipette und Suspensionsgefäss in Anordnung zur Beimpfung.

1 Druckluft (ölfrei)
2 Druck-Feinregulierung
3 Luftfilter, steril
4 Verbindungsschlauch (Silicon-Gummi)
5 Gummimanschette, beweglich
6 Absaugrohr, die Eingangsöffnung soll möglichst klein sein, damit das Druckgefälle genügend gross wird.
7 Schräg-Agar Kultur
8 Suspensionsgefäss, enthält 5–10 ml Tween-80-Lösung, 0,1 % in H_2O bidest. Endvolumen = 25 ml.
9 Sporenfalle, enthält Aethanol 70%
10 Glasrohr mit Gazeverschluss, als Verschluss des Absaugrohr-Einganges.
11 Haltegefäss
12 Impfpipette

Erythrocyten-Zählkammer nach Thoma zehnmal ausgezählt. Allerdings wurde die Zählung immer erst nach der Beimpfung der Versuchskolben vorgenommen, um jede Verunreinigung der Sporensuspension zu vermeiden. Somit wurde zwar mit bekannter, aber nicht in jeder Versuchsserie gleich grosser Sporenzahl pro Kolben gearbeitet. Die Beimpfung der Versuchskolben mit der frisch hergestellten Sporensuspension erfolgte immer innerhalb von 24 Stunden. Das Impfvolumen wurde möglichst klein gehalten und betrug pro Kolben 6 Tropfen, was bei der verwendeten Impfpipette 0.21 ml entsprach. Vor jeder Beimpfung wurde die Suspension auf einem Vibrator während 30 Sekunden bei gleichbleibender Vibrationsstärke geschüttelt.

Reinigung der Glaswaren

Es wurden prinzipiell nur Pyrex-Glaswaren oder Geräte aus Polypropylen oder Teflon verwendet. Neue Glaswaren werden nach normaler Seifenreinigung mit entsalztem Wasser



Figur 2:
Apparatur zum Ausdämpfen der Glaswaren mit HCl. Erklärung im Text.

gefüllt und bei 1 Atü autoklaviert. Anschliessend werden sie in HCl/Wasser 1:1 über Nacht stehen gelassen, dann mit Leitungswasser und zuletzt mit entsalztem Wasser gründlich gespült und getrocknet. Alle Glaswaren die zum Versuch benötigt werden, werden nach normaler Reinigung, möglichst kurz vor Gebrauch mit HCl 20% während 20 Minuten ausgedämpft. Das Ausdämpfen der Glasgefässe wurde mit der in Figur 2 dargestellten Apparatur durchgeführt. In einem grossen Glasgefäss (Duran-50, Typ ZR Büchi AG Uster), wird das Wasser/HCl-Gemisch zum kochen gebracht (Isolation des Gefässes durch Asbest-Gewebe), wobei der Dampf durch die Öffnungen in der dicht aufliegenden Deckplatte in die fest aufgespannten Glasgefässe gelangt, wie es aus Figur 2A und B ersichtlich ist. Das Kondensat läuft dabei kontinuierlich in den Säurebehälter zurück, wodurch die Schwermetalle weitgehend aus den Glasoberflächen eluiert werden. In die Öffnungen der Deckplatten aus Polypropylen können, je nach dem Durchmesser der Öffnungen der zu behandelnden Glasgefässe, verschiedene Einsätze eingelegt werden (Fig. 2C/D). Anschliessend werden die Gefässe mehrmals gründlich mit H_2O bidest. gespült und möglichst staubfrei getrocknet. Sehr kleine Gefässe und alle Geräte, die nicht ausgedämpft werden konnten, wurden durch einlegen in heisse, analysenreine HCl 20% während einer Stunde gereinigt. Nach Gebrauch im Versuch, werden alle Glaswaren mit Seifenlösung und HCl gereinigt, wie es für neue Glaswaren oben beschrieben ist, unter Weglassung der Behandlung im Autoklaven. Die Glassinter-Fritten (Pyrex P4), die zum Abfiltrieren des CuS-Niederschlages bei der Reinigung der Stammlösung der Makroelemente gebraucht werden, werden folgendermassen gereinigt: **Fabrikneue Fritten:** Füllen mit heissem Königswasser (1 Teil HNO_3 p.A. / 3 Teile HCl p.A.), durchfliessen lassen durch Eigendruck der Lösung. Gründlich spülen mit H_2O bidest. Trocken saugen. **Vorbereitung zum Gebrauch:** Heisse HCl 20% p.A. durchfliessen lassen. Gründlich spülen mit H_2O bidest. Trocken saugen. **Reinigung nach Gebrauch:** Mit heissem Königswasser zunächst die CuS-Niederschagsschicht ablösen und abgiessen. Füllen mit frischem, heissem Königswasser und durchfliessen lassen. Vorgang so oft wiederholen, bis aller Niederschlag restlos gelöst und ausgespült ist. Gründlich mit H_2O bidest. spülen. Trocken saugen. Die Frittenoberfläche muss nach der Reinigung wieder schneeweiss sein.

Entfernung von Schwermetall-Verunreinigungen aus der Stammlösung der Makroelemente

Zur Entfernung der Schwermetall-Verunreinigungen, die durch die verwendeten Chemikalien in die Stammlösung der Makroelemente eingeführt werden, wurde eine Fallung dieser Elemente in Form ihrer Sulfide mit Hilfe von CuS als Träger, nach den Angaben von Hewitt (Hewitt 1966, p. 441) und Koch (Koch und Koch-Dedic 1964) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Stammlösung der Makroelemente Kupfersulfat-Lösung zugesetzt, und während 30–60 Minuten H_2S eingeleitet. Der schwarze Niederschlag der Sulfide wird abfiltriert und das ganze Verfahren wiederholt. Nach Entfernung des überschüssigen H_2S durch Verkochen und nach einer letzten Filtration, wird eventuell noch vorhandenes Kupfer durch ausschütteln der Lösung mit Dithizon, entfernt. Der pH-Wert der Lösung der Makroelemente liegt wenig unter pH 4, sinkt beim Einleiten von H_2S aber rasch auf ca. pH 2. Es wurde deshalb darauf verzichtet, den pH-Wert der Lösung vor der Fällung auf pH 2 einzustellen (Koch und Koch-Dedic 1964, Nicholas 1952). Zur Extraktion überschüssigen Kupfers mit Dithizon, wird der pH-Wert unverändert (ca. pH 2.2) gelassen. Nach Koch (Koch und Koch-Dedic 1964 Tab. 81 p. 237) sollen Kupferdithizonate im pH-Bereich von 2–5 vollständig extrahiert werden.

Die MeS-CuS-Fällung wurde in Pyrex Rundkolben, die mit Schliffansätzen für Gaseinleitungs- und -ableitungsrohre sowie für die Rührführung versehen waren, ausgeführt. Durch eine derart geschlossene Apparatur werden Staubverunreinigungen aus der Luft, während der immerhin mehrere Stunden dauernden Prozedur, weitgehend verhindert. Beim Filtrieren sind Rundkolben deshalb vorteilhaft, weil sie in jeder beliebigen Stellung abgestellt werden können, und so ein störendes Aufwirbeln des Niederschlages verhindert wird. Zur Filtration wurden Pyrex Glassinterfritten von der Porosität P4, mit einem Durchmesser von 10 cm und 1 l Fassungsvermögen verwendet. Sie waren ebenfalls mit Normalschliffen versehen, so dass das Absaugen über Schliffvorstösse direkt in die Schliff-Rundkolben vorgenommen

werden konnte. Da äusserste Sauberkeit der Filtrationsvorrichtung geboten ist, dürfen keine Gummibestandteile verwendet werden, sondern alle Apparaturen müssen mit Schliffverbindungen versehen sein. Die Glasfritten dürfen, wenn sie ausser Gebrauch sind, nicht abgelegt werden, sondern müssen auf passende Haltegefässe aufgesetzt werden (z.B. Erlenmeyerkolben mit passendem Schliff). Die oben beschriebene Reinigung der Fritten lässt sich so auch leicht durchführen. Es hat sich als praktisch erwiesen, wenn jeweils drei Filtrations-Sets (Fritte-Vorstoss-Rundkolben, bzw. Haltegefässe) sauber zur Verfügung standen.

H_2S wurde durch erwärmen von Schwefel-Paraffinstäbchen erzeugt. Der H_2S-Strom wurde 1. durch eine gesättigte Ba $(OH)_2$-Lösung, zur Absorption von Polysulfiden, 2. durch entsalztes Wasser, und 3. durch eine Spritzfalle, bestehend aus gereinigter Glaswolle, geleitet, und gelangte schliesslich durch eine grobe Glasfritte in die $CuSO_4$-haltige Lösung der Makroelemente. Damit die Fällung vollständig wird, und eine Zusammenballung des kolloidalen Niederschlages stattfindet, die allein ein sauberes Abfiltrieren erlaubt, ist es wichtig, dass die Suspension nach der Fällung genügend lange stehen gelassen wird. Eventuell muss das Filtrat durch zusätzliches Einleiten von H_2S auf Vollständigkeit der Fällung des zugesetzten CuS geprüft werden. Es konnte vorkommen, dass die Stammlösung der Makroelemente nach dieser Reinigungsprozedur gelb gefärbt, obwohl vollkommen klar, war. Es könnte sich bei der Färbung um gelöste Polysulfide handeln. Es ist jedoch kein störender Einfluss auf das Wachstum von *Aspergillus niger* beobachtet worden.

Arbeitsvorschrift:

I. Fällung der Sulfide: Makroelemente nach Vorschrift für 2000 ml einwägen, und in 1000 ml H_2O bidest. lösen. (Ergibt ca. 1500 ml Lösung), pH messen und in 3 L Rundkolben geben. 15 ml $CuSO_4$-Lösung 19,5% zugeben. (10 ml $CuSO_4 . 5H_2O$ 19,5% pro L Lösung).

1. Fällung: Unter umrühren während 45 Minuten H_2S in die kalte Lösung einleiten. (Es werden ca. 70 g Schwefel-Paraffinstäbchen, „Sulfidogen" Merck, benötigt). Anschliessend unter umrühren während ca. 30 Minuten leicht erwärmen, um Hauptüberschuss an H_2S zu entfernen. 2 Stunden stehen lassen (die Lösung muss zur Filtration abgekühlt sein).

1. Filtration: Lösung sorgfältig auf Fritte giessen, ohne den Niederschlag aufzuwirbeln. Mit durchsaugen der Lösung erst beginnen, wenn sich eine dünne Schicht auf der Fritte abgesetzt hat. Während des ganzen Filtrationsvorganges nur schwach saugen. Nie trocken saugen zwischen den einzelnen Zugaben. Fällungskolben mit wenig H_2O bidest. ausspülen, und Niederschlag auf der Fritte mit H_2O bidest. auswaschen.

2. Fällung: Filtrat in Fällungskolben zurückgiessen. $CuSO_4$-Lösung zugeben, H_2S einleiten und weiterbehandeln wie bei 1. Fällung, dann über Nacht stehen lassen.

2. Filtration: Vorgehen wie bei 1. Filtration, aber saubere Fritte und sauberen Rundkolben verwenden.

Verkochen des H_2S: Filtrat im Rundkolben zu leichtem Sieden erwärmen, bis kein H_2S mehr entweicht, jedoch mindestens während 2 Stunden (Probe mit Pb-Acetat-Papier).

3. Filtration der gereinigten Lösung zur Abtrennung koagulierter Schwefelrückstände, durch saubere Fritte in sauberen Kolben. Fritte mit wenig H_2O bidest. nachspülen. pH messen.

II. Entfernung von Cu-Spuren durch Extraktion mit Dithizon.

1. Gereinigte Lösung von ca. pH 2.2 in einen Scheidetrichter (Pyrex, 3 L) geben, und mit je 50 ml *gereinigter Dithizonlösung* (Reinigung der Dithizonlösung nach Hewitt 1966, p. 438). *0.1%* in Chloroform ($CHCl_3$ Merck p.A. zur Dithizonbestimmung, enthält 0,6–1,0% Aethanol), solange ausschütteln, bis keine Spur von rosa, violett oder braun in der unteren Phase erscheint.

2. Zuletzt einmal mit verdünnter *Dithizonlösung 0.005%* ausschütteln. Diese Phase soll mehrere Tage hellgrün bleiben.

3. Dithizon ganz entfernen durch einmaliges ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4 reinst, Merck, zur Dithizonbestimmung). Dadurch wird auch die Trennung der Phasen besser. Zur vollständigen Trennung der organischen von der wässrigen Phase, werden die Lösungen im Scheidetrichter über Nacht stehen gelassen, und einige Male leicht umgeschüttelt.

4. Die Stammlösung der Makroelemente wird nun in einem Masskolben auf das Endvolumen aufgefüllt mit H_2O bidest. und in eine Aufbewahrungsflasche abgefüllt.

5. Restliches CCl_4 wird aus der Lösung durch erwärmen vertrieben. (Offene Flasche ca. 30 Min. in Wasserbad von 60° C stellen.)

Stammlösungen zur Herstellung der Nährlösung

Stammlösung der Makroelemente: Die Substanzen wurden in analysenreiner Qualität verwendet. Glucose D (+) 250 g, KNO_3 25 g, $NaH_2PO_4 . H_2O$ 11.1 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ 5 g, $Ca(NO_3)_2$ 1 ml einer 2M Stammlösung, alles ad 1000 ml H_2O bidest. Diese Lösung wird nach den Angaben auf Seite 120 ff. gereinigt.

Stammlösung der Mikroelemente: Es wurden spektralreine Substanzen der Firma Johnson-Matthey, London verwendet. Eine $FeCl_3$-Stammlösung wurde hergestellt, indem spektralreines Fe^{III}-Oxyd in konzentrierter HCl (Spektralrein, Uvasol Merck) gelöst, und unter kochen in $FeCl_3$ übergeführt wurde. Das Präparat wurde in 0.02 N HCl (spektralrein) aufgenommen, und der Eisengehalt komplexometrisch (Schwarzenbach 1960) bestimmt. Aus dieser Stammlösung wurde eine 1% $FeCl_3$-Lösung in HCl 0.01N durch Verdünnung hergestellt.

$ZnSO_4 . 7H_2O$ 0.431 g, $CuSO_4 . 5H_2O$ 0.147 g, $MnSO_4 . 5H_2O$ 0.110 g, $CoSO_4 . 7H_2O$ 0.025 g, $NiSO_4 . 7H_2O$ 0.024 g, $FeCl_3$ 5 ml einer 1% Stammlösung, HCl konz. spektralrein 0.5 ml, alles ad H_2O bidest. 500 ml. Die Lösung ist 0.01 N an HCl.

Stammlösungen der Molybdänverbindungen: Alle Molybdänlösungen werden mit H_2O bidest. angesetzt, und sind 0.01 N an HCl (spektralrein).

I $Na_2MoO_4 . 2H_2O$ (p.A. Merck)

Durch Einwaage wurde eine **konzentrierte Stammlösung** hergestellt mit einem theoretischen Gehalt von **4000 µg Mo/ 1000 ml** resp. **4 µg Mo/ml**, also einer **Molarität** von $4.17 . 10^{-5}$.

Die geringfügigen Abweichungen des effektiven Molybdängehaltes vom theoretischen Wert, die sich bei der Einwaage ergaben, sind in den Tabellen für jeden Versuch angegeben.

Im Versuch werden folgende Stammlösungen benützt, die durch Verdünnung aus der konzentrierten Stammlösung hergestellt werden:

(1) 40 µg Mo/1000 ml resp. 0.04 µg Mo/ml
(2) 50 µg Mo/1000 ml resp. 0.05 µg Mo/ml
(3) 5 µg Mo/1000 ml resp. 0.005 µg Mo/ml

Die **Molybdän-Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Komplexe** wurden im Anorg. Chem. Institut der Universität Basel hergestellt und geprüft, und von Prof. Dr. S. Fallab freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

II Mo^{VI}-EDTA:

$Na_4Mo_2O_{14}H_{12}C_{10}N_2 . 5H_2O$

(II und III dargestellt nach Pecsok und Sawyer 1956)

III Mo^{V}-EDTA:

$Na_2Mo_2O_{12}H_{12}C_{10}N_2 . H_2O$

IV Mo^{III}-EDTA:

Diese Substanz ist in kristallisierter Form nicht fassbar, sondern liegt in salzsaurer Lösung vor. Die Konstitutionsformel ist nicht bekannt, wird aber als der Formel für Fe^{III}-EDTA analog angenommen. Die Molybdänkonzentration des Präparates war: **0.0226 Molar.** (Dargestellt nach Palmer 1964 p. 404.)

Konzentrierte Stammlösung:

Theoretischer Molybdängehalt: **5000 µg Mo/1000 ml** resp. **5 µg Mo/ml**
(2) 50 µg Mo/1000 ml resp. 0.05 µg Mo/ml
(3) 5 µg Mo/1000 ml resp. 0.005 µg Mo/ml

Folgende Konzentrationsreihen sind unter Verwendung der Stammlösungen (2) und (3) angewendet worden.

µg Mo / 50 ml Versuchslösung

I 0.00025 / 0.0005 / 0.001 / 0.002 / 0.003 / 0.004 / 0.005 / 0.01
II 0.0005 / 0.001 0.0025 0.005 / 0.01

Die Volumenmässige Zugabe pro Kolben wurde so eingerichtet, dass sie innerhalb von **0.05 ml – 0.5 ml** blieb.

Pufferlösungen

Phosphatpuffer: $NaH_2PO_4 . H_2O$ (p.A.), 0.1 M, eingestellt auf pH 2.0 / 2.5 mit HCl $^1/_2$ konz.
Tartratpuffer: d-Weinsäure (p.A.), 0.1 M, eingestellt auf pH 2.0 / 2.5 / 3.0 mit HCl 1 N und NaOH 1 N, respektive.
Citratpuffer: Citronensäure (p.A.), 0.1 M, eingestellt auf pH 2.0 / 2.5 / 3.0 mit HCl 1 N und NaOH 1 N, respektive.
EDTA-Puffer: EDTA-Dinatriumsalz (Komplexon III, p.A.) 0.05 M, eingestellt auf pH 3.1 mit HCl $^1/_2$ konz.

Durchführung des Versuchs

Versuchslösung: 200 ml Stammlösung der Makroelemente
2 ml Stammlösung der Mikroelemente
ad 1000 ml H_2O bidest.

Der **pH-Wert** dieser Lösung beträgt ca. **2.6**, wenn die Stammlösung der Makroelemente der CuS-Fällung durch H_2S unterworfen worden war. Einstellen eines tieferen pH-Wertes mit HCl 5 N (spektralrein).

Je 50 ml dieser Lösung werden in die Versuchskolben abgefüllt, und die Molybdänlösungen in die einzelnen Kolben pipettiert. Anschliessend Sterilisation im Autoklaven: 30 Minuten bei 1 Atü, 120°C.

In den Vorversuchen mit einheitlicher Molybdänkonzentration von 0.01 µg Mo / 50 ml Versuchslösung, wurde die Molybdänlösung vor dem Abfüllen der Kolben gesamthaft zur Versuchslösung gegeben. 1000 ml Versuchslösung enthalten dann 5 ml Na_2MoO_4-Lösung (1).

Gepufferte Versuchslösungen: Für die Versuche mit gepufferten Medien wurden die Substanzen der Stammlösung der Makroelemente in der jeweiligen Pufferlösung vom gewünschten pH-Wert gelöst. Entsprechend wurde die Versuchslösung mit Pufferlösung vom gewünschten pH-Wert, anstelle von Wasser, aufgefüllt.

Versuchsansatz: Beimpfen der sterilen Versuchkolben mit je 6 Tropfen (0.21 ml) Sporensuspension, die aus Vorkulturen von *Asperillus niger* auf Malz-Agar (Hewitt), gewonnen wurde. Die Versuche wurden bei 25°C ± 0.5°C im Dunkeln durchgeführt. Bei Wachstumsversuchen in Abhängigkeit von der Konzentration betrug die Kulturdauer 6 Tage. Die Kolben wurden im Brutschrank nach dem Prinzip des „lateinischen Quadrates" angeordnet.

Versuchsabbruch: In Versuchen in Abhängigkeit von der Zeit werden die Kolben zufällig zum Abbruch ausgewählt. Die Myceldecken (nicht abgetötet) werden auf vorgetrocknete und gewogene Rundfilter (Schleicher und Schuell Nr. 595) abgenutscht. Das Filtrat wird zur pH-Messung zurückbehalten. Das Mycel, vor allem die Unterseite, wird mit H_2O (entsalzt) gründlich gewaschen und möglichst trocken gesaugt. Das Rundfilter mit dem Mycel wird in offener Petrischale bei 90°C während 24 Stunden getrocknet, anschliessend im Exsikkator über Silikagel abgekühlt, und zur Trockengewichtsbestimmung gewogen.

Vorversuche

In einer Reihe von Vorversuchen wurden zunächst **Standard-Wachstumskurven**, gemessen am Myceltrockengewicht, in Abhängigkeit von der Zeit bei optimaler Molybdänkonzentration von 0,01 µg Mo / 50 ml Nährlösung (2.10^{-9} M), zugegeben als Na_2MoO_4, aufgestellt.

In diesem Konzentrationsbereich können die Molybdänverunreinigungen aus den Chemikalien und den Glasgeräten vernachlässigt werden. Es konnte daher auf die, im methodischen Teil beschriebenen, aufwendigen speziellen Reinigungsverfahren von Lösungen und Glasgeräten vorläufig verzichtet werden. Diese Standardkurven dienen deshalb gleichzeitig zur Kontrolle über die vollständige Entfernung toxischer Substanzen, wie H_2S, $CHCl_3$ und CCl_4, die beim Reinigungsverfahren der Stammlösung der Makroelemente in den Hauptversuchen zur Anwendung gelangen.

Unter den unveränderten Bedingungen der Arbeitsvorschrift nach Hewitt (Hewitt 1966), wird in einer nicht speziell gepufferten Nährlösung mit einem Anfangs-pH-Wert von ungefähr 4.2 und bei einer Temperatur von 25°C gearbeitet. Die Wachstumskurve, die man unter diesen Bedingungen erhält, dargestellt in Figur 3 (1), ist charakterisiert durch eine Latenzzeit von ca. 3 Tagen, die wohl der mittleren Dauer für die Sporenkeimung entspricht, einer exponentiellen Wachstumsphase, deren grösste Steigung zwischen dem 4. und 6. Tag liegt, einem Maximum, das vom 7. Tag bis zum 8. Tag erreicht werden kann, und welchem fast unmittelbar ein Wachstumsrückgang folgt, der mit einer Lysis des Mycels verbunden ist.

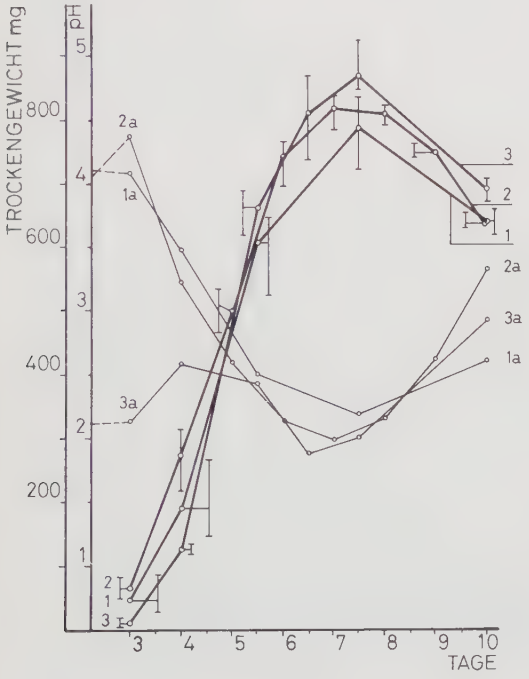
Eine Versuchstemperatur von 25°C ±0,5°C kann, wie auch aus eigenen orientierenden Versuchen hervorgeht, als optimal betrachtet werden. Der Temperatureinfluss auf die Wachstumskurve ist unter den übrigen oben beschriebenen Bedingungen, bei 23°C, 25°C, und 27°C geprüft worden. Die Wachstumsgeschwindigkeit während der exponentiellen Phase wird nur unbedeutend verändert. Die Temperaturunterschiede scheinen hauptsächlich die Sporenkeimung, und dadurch die Dauer des gesammten Versuchablaufes zu beeinflussen. Bei 23°C geht die Sporenkeimung bereits so langsam vor sich, dass nach der Latenzzeit eine messbare Beschleunigungsphase auftritt, wodurch sich der Versuchsablauf bis zur Erreichung des Maximums um zwei Tage verlängert. Die Temperatursteigerung von 25°C auf 27°C bringt keine weitere Verkürzung der Versuchsdauer mit sich.

pH-Einfluss

Zur Prüfung der Wirkung verschiedener Molybdänverbindungen auf das Wachstum von *Aspergillus niger,* und indirekt auf die Aktivität der Nitratreduktase (Hauptversuche), wurde in Abweichung von der Arbeitsvorschrift nach Hewitt (1966) geplant, bei einem möglichst tiefen pH-Wert, um pH 2, zu arbeiten. Dieser Wahl lagen einerseits die Angaben von Nicholas (1952), und andererseits die folgenden Überlegungen zu Grunde.

Über die spezifischen Wirkungen der H^+-Ionenkonzentration im Nährmedium auf den biochemischen Reaktionsablauf in den Zellen ist relativ wenig bekannt.

Es wird vorläufig angenommen, dass der aussen angelegte pH-Wert vor allem die Zelloberflächen und die Permeabilität der Oberflächenmembranen beeinflusse (Cochrane V.W. 1966). Die intrazelluläre H^+-Ionenkonzentration und damit die enzymatische Aktivität in der Zelle würde demnach nur mittelbar beeinflusst. Eine tiefgreifende Verschiebung des pH-Optimums durch die H^+-Ionenkonzentration im Medium, ist für ein Enzymsystem wie die Nitratreduktase, das sich im Zellinnern, gelöst im Cytoplasma befinden soll (Kessler 1964, Wallace W./ Nicholas D.J.D. 1969), nicht unbedingt zu befürchten. Das Nitratreduktase-System wird durch sein Substrat Nitrat induziert und einerseits durch Ammonium, dem Endprodukt der Nitratreduktion (Nicholas D.J.D. in Ainsworth, Kap. III 1965), andererseits möglicherweise auch durch einen Überschuss an noch nicht Substrat-gebundenem Enzym selbst (Cove D.J. 1967), unterdrückt. Ein stetiger und genügender Nitratnachschub während eines ganzen Versuchs sollte daher eine möglichst gleichbleibende Enzymaktivität gewährleisten, so dass allein die begrenzende Wirkung des Cofaktors Molybdän geprüft werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Nitrataufnahme aus der Lösung durch pH-Werte unter 3 gefördert wird (Foster J.W. 1949, Peter M. 1956, Cochrane V.W. 1966). Durch einen, während der ganzen Versuchsdauer möglichst gleich bleibenden, tiefen pH-Wert des Mediums, könnten also im obigen Sinn günstige Verhältnisse geschaffen werden. Durch die Förderung der selektiven Aufnahme von Nitrat vor Ammonium, durch einen pH-Wert um oder unter 3, können ausserdem störende Einflüsse von als Verunreinigung eingeschleppten Spuren ammoniakalischen Stickstoffs verringert werden.



Figur 3:
Aspergillus niger:
Einfluss des Anfangs pH-Wertes in ungepufferten Lösungen auf das Wachstum.
0.0102 µg Mo / 50 ml (Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
1,2 . 10^6 Sporen/Kolben (50 ml Nährlösung)
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
1) pH 4.2 Mittelwerte aus N = 5
2) pH 3.1 Mittelwerte aus N = 3
3) pH 2.1 Mittelwerte aus N = 5
pH-Kurven: 1a) 2a) 3a) respektive.
I = Variationsbreite

Tabelle 1:

Vergleich des Wachstums von *Aspergillus niger* bei verschiedenem Anfangs-pH-Wert in ungepufferten Lösungen. 1,2 . 10^6 Sporen pro Kolben (50 ml Nährlösung) 0,0102 µg Molybdän / 50 ml (Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar) Versuchstemperatur: 25°C. (a) und (c) Mittelwerte aus N = 5, (b) Mittelwert aus N = 3. Vb = Variationsbreite: Differenz zwischen dem maximalen und minimalen Wert. Vb der pH-Werte ausgedrückt in pH-Einheiten. TG = Trockengewicht.

Versuchslsg. Anfangs-pH	Tage	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH
(a)	3	48	63	4.1	0.19
	4	191	121	3.5	0.2
4.2	5.5	611	119	2.5	0.19
	7.5	795	96	2.2	0.15
	10	646	112	2.6	0.92
(b)	3	69	32	4.4	0.18
	4	278	96	3.3	0.43
3.1	5	501	72	2.6	0.20
	6	742	70	2.1	0.15
	7	823	57	2.0	0.04
	8	815	34	2.1	0.39
	9	755	16	2.6	0.35
	10	644	25	3.3	0.22
(c)	3	11	4	2.1	0.02
	4	125	17	2.6	0.20
2.1	5.5	666	72	2.4	0.20
	6.5	816	133	2.0	0.10
	7.5	879	78	2.0	0.05
	10	696	38	3.0	0.32

Versuche zum pH-Einfluss in ungepufferten Lösungen

Zunächst wurde der Einfluss von Anfangs-pH-Werten von 3.1 und 2.1, verglichen mit pH 4.2 in der nicht speziell gepufferten Nährlösung nach Hewitt (1966) auf die zeitabhängige Wachstumskurve von *Aspergillus niger* geprüft. Die in Figur 3 (Tabelle 1) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die tieferen pH-Werte das Mycelwachstum, gemessen an der Wachstumsgeschwindigkeit während der exponentiellen Phase und der maximalen Trockengewichtsausbeute, nicht hemmen. Hingegen scheint bei pH 2 die Sporenkeimung langsamer vor sich zu gehen. Sobald aber das Mycelwachstum eintritt, zeigt sich sogar eine Tendenz zu einer Wachstumssteigerung bei tieferen pH-Werten, wie sie nach den dargelegten theoretischen Erwägungen erwartet werden konnte. Ein orientierender Versuch hat gezeigt, dass die untere pH-Grenze bei ungefähr pH 1.8 zu liegen scheint. Bei diesem Wert findet sozusagen kein Wachstum mehr statt, wobei nicht unterschieden werden konnte, ob es sich bei dem Effekt um eine gänzliche Unterdrückung der Sporenkeimung, oder auch um die Hemmung des Mycelwachstums handelt. Besondere Beachtung in bezug auf den pH-Einfluss, muss auch dem zeitlichen **pH-Verlauf** während eines solchen Wachstumsversuchs geschenkt werden. Der Verlauf der pH-

Kurve während eines zeitabhängigen Wachstumsversuchs ist bei normalem Wachstum des Pilzes ebenso charakteristisch, wie die Myceltrockengewichtskurve (Fig. 3, Tab. 1). Bei einem Anfangs-pH über 4 sinkt der pH-Wert mit dem Einsetzen der Sporenkeimung stetig, in sehr starkem Mass vor allem während des steilen Wachstumsanstieges, und beginnt mit der Erreichung des Maximums und während dem Wachstumsrückgang wieder zu steigen. Bei tieferem Anfangs-pH-Wert um 3 und 2, verläuft die pH-Kurve prinzipiell gleich, es tritt aber zwischen Zeit 0 und dem Eintreten der exponentiellen Wachstumsphase, ca. am 4. Tag, ein unter Umständen erheblicher pH-Anstieg auf. Wodurch dieser Anstieg während der Sporenkeimung zustande kommt, konnte nicht abgeklärt werden. Die Senkung des pH-Wertes im Zeitintervall des stärksten Mycelwachstums muss auf der Abgabe verschiedener organischer Säuren als Stoffwechsel-Endprodukte beruhen, wie das für viele Kohlenstoff-heterotrophe Mikroorganismen bekannt ist.

Liegt der Anfangs-pH-Wert über 2.5, so durchläuft die pH-Kurve in Versuchen mit ungepufferten Lösungen, während des ganzen Versuchs von zehn Tagen, ein Intervall von mindestens 2 pH-Einheiten. In einer Nährlösung von sehr tiefem pH-Wert, wie pH 2, ist jedoch die pH-Schwankung über den ganzen Versuch wesentlich geringer, und beträgt nur ungefähr 0.7 pH-Einheiten. Die Acidität der Nährlösung von pH 2 bewirkt eine leichte Pufferung gegen die Säureabgabe in das Medium durch das wachsende Mycel.

Tabelle 2:
pH-Differenz, in pH-Einheiten, zwischen höchstem und tiefstem Wert jeweils während eines ganzen Versuchs.

	pH-Wert der Versuchslösung					
Differenz in:	2.0	2.1	2.5	3.0	3.1	4.2
ungepufferten Lösungen		0.7	1.5		2.4	2.0
Phosphatpuffer 0.1 M	0.4		0.7			
Tartratpuffer 0.1 M	0.4		0.7	0.8		
Citratpuffer 0.1 M	0.4		0.8	1.0		

Versuche in gepufferten Nährlösungen

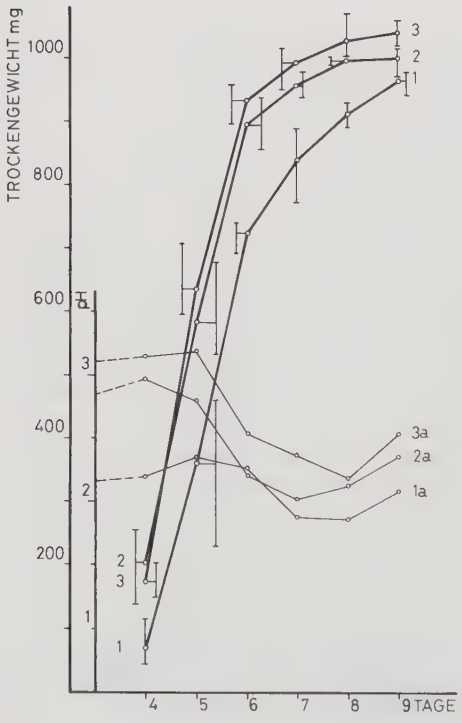
Durch eine Pufferung der Nährlösung wurde versucht, die pH-Differenz während des Versuchs möglichst noch zu verringern. Allerdings ist die Auswahl an Puffersubstanzen, deren pK_a-Werte zwischen 2 und 3 liegen, relativ gering.

Ausserdem kommen einige organische Säuren deshalb nicht in Frage, weil sie an sich toxisch auf den Versuchsorganismus wirken. In den vorliegenden Versuchen wurde die Wirkung von **prim. Natriumphosphat** pK_a 2.1, **d-Weinsäure** pK_a 3.0, **Citronensäure** pK_a 3.1 und **EDTA** pK_a 2 und 2.6, geprüft.

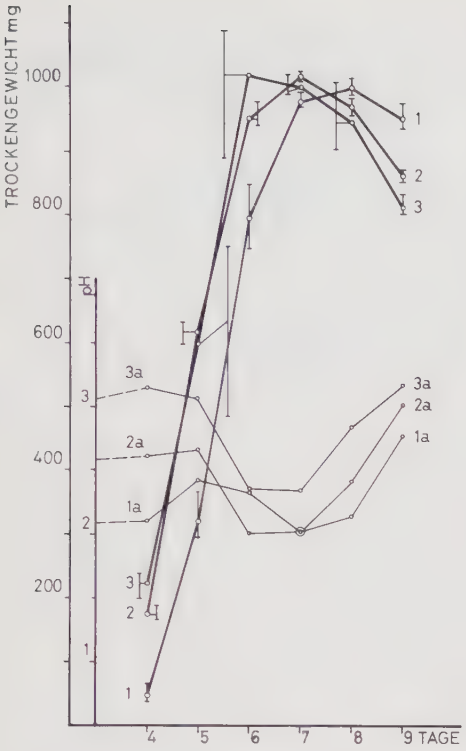
Die gepufferten Nährlösungen waren 0.1 Molar an jeweiliger Puffersubstanz, ausser im Falle von EDTA, dessen geringere Löslichkeit nur die Anwendung einer 0.05 molaren Lösung erlaubte. Die Puffer wurden zum Versuch je auf die Werte von pH 2.0, pH 2.5 und pH 3.0 eingestellt. In den Figuren 4–7 (Tab. 2 und 3) sind die Resultate dieser Pufferversuche dargestellt.

Die Pufferung unterdrückt vor allem den pH-Anstieg während der Sporenkeimung und in der ersten Wachstumsphase, wie er in den Versuchen mit ungepufferten Lösungen von tiefem pH-Wert beobachtet werden konnte. In den gepufferten Lösungen von pH 2 bewirkt dies eine starke Hemmung der Mycelentwicklung und dadurch eine empfindliche Verlangsamung des Versuchsablaufes, verglichen mit den entsprechenden Werten in ungepufferten Lösungen bei pH 2. Es scheint also, dass bei tiefem pH-Wert die initiale H^+-Ionenkonzentration die Mycelentwicklung weniger beeinflusst, als dies durch die Unterdrückung einer offenbar gesetzmässigen Änderung des pH-Wertes während der ersten Entwicklungsphase geschieht.

Werden in biologischen Versuchen die Nährlösungen gegen pH-Änderungen gepuffert, müssen Nebenwirkungen besonders berücksichtigt werden, die durch



Figur 4:
Aspergillus niger:
Wachstum in gepufferten Nährlösungen.
Citratpuffer 0.1 Molar
0.0105 µg Mo / 50 ml
(Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
$3{,}6 \cdot 10^5$ Sporen/Kolben
(50 ml Nährlösung)
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
1) pH 2.0
2) pH 2.5
3) pH 3.0
pH-Kurven: 1a) 2a) 3a) respektive.
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

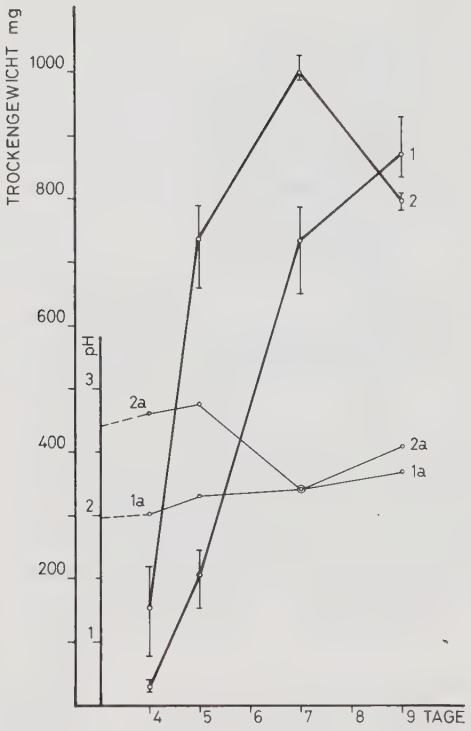


Figur 5:
Aspergillus niger:
Wachstum in gepufferten Nährlösungen.
Tartratpuffer 0.1 Molar
0.0105 µg $Mo_{/}$ 50 ml
(Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
3,4 . 10^6 Sporen pro Kolben
(50 ml Nährlösung)
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
1) pH 2.0
2) pH 2.5
3) pH 3.0
pH-Kurven: 1a) 2a) 3a) respektive.
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

direktes Eingreifen der Puffersubstanzen in den Stoffwechsel des Test-Organismus, unabhängig von der eigentlichen Pufferwirkung, auftreten können. Verschiedene Carbonsäuren, darunter besonders die hier verwendete Citronensäure, können als zusätzliche Kohlenstoffquelle benützt werden. Ferner stellen Citrate und Tartrate in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, relativ gute Komplexbildner für verschiedene Elemente dar (Cochrane V.W. 1966 p. 80 ff.). Ausserdem sollen einige Tricarbonsäuren, worunter wiederum Citronensäure, die Nitrataufnahme bei tiefem pH-Wert spezifisch fördern (Peter M. 1956).

Durch eine Pufferung, wie sie in den vorliegenden Versuchen durchgeführt wurde, wurden somit zusätzliche und im einzelnen nicht kontrollierbare Parameter geschaffen.

Aus dem Versuch mit Citronensäure als Puffersubstanz, (Fig. 4), geht hervor, dass diese von *Aspergillus niger* direkt als C-Quelle benützt wurde. Die Wachstumskurven erreichen, bei gleicher Wachstumsgeschwindigkeit wie die Standardkurven, (ungepufferte Nährlösung), das Maximum innerhalb von neun Tagen noch nicht, und zeigen vor allem keinen abrupten Wachstumsrückgang. Im Falle der Weinsäure (Fig. 5), wie in demjenigen der Citronensäure wird das Myceltrockengewicht gegenüber demjenigen der ungepufferten Lösungen erhöht. Ausserdem wird die Variationsbreite der einzelnen Messwerte, vor allem bei pH 3.0, sehr viel grösser. Auch bei der Prüfung von Natriumphosphat als



Figur 6:
Aspergillus niger:
Wachstum in gepufferten Nährlösungen.
Phosphatpuffer 0.1 Molar
0.0105 µg Mo / 50 ml
(Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
4,8 . 10^6 Sporen/Kolben
(50 ml Nährlösung)
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
1) pH 2.0
2) pH 2.5
pH-Kurven: 1a) 2a) respektive.
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

Puffersubstanz (Fig. 6), zeigt sich bei pH 2.5, bei sonst unveränderten Charakteristika der Wachstumskurve, eine Trockengewichtszunahme. Es ist zu beachten, dass die Anwendung eines 0.1 molaren Natriumsphosphatpuffers eine fünffache Erhöhung der Phosphat- und der Natriumionen-Konzentration in der Nährlösung bewirkt, verglichen mit der ungepuffert verwendeten Nährlösung nach Hewitt (1966).

Sporenbildung

In allen bis jetzt beschriebenen Versuchen ist die Konidiosporenbildung auf den Deckenkulturen qualitativ beobachtet worden. Allgemein zeigt sich, dass bei einem pH-Wert um 2 während des Versuchs, die Bildung von Konidiosporen stark gehemmt ist, obwohl die wenigen entstehenden Sporen normale Grösse und tiefschwarze Färbung zeigen. Eine Ausnahme bildet das an Citronensäure 0.1 molare Medium von pH 2.0, indem hier die Sporen klein und bräunlich bleiben, und auffallend viele sterile Kondidienträger festzustellen sind. Zwischen den pH-Werten von 2.5 und 3.0 lässt sich qualitativ meist kein Unterschied feststellen. In den durch Tartrat und Citrat gepufferten Medien von pH 2.5 und 3.0 setzt die Sporenbildung schon am vierten Tag ein, in ungepufferten Lösungen von entsprechendem pH-Wert mindestens einen Tag später, und es bilden sich

Tabelle 3:

Wachstum von *Aspergillus niger* in gepufferten Nährlösungen.
0.0105 µg Molybdän / 50 ml Nährlösung (Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar). Versuchstemperatur: 25° C.
Mittelwerte aus N = 3. Vb = Variationsbreite: Differenz zwischen dem maximalen und minimalen Wert. Vb der pH-Werte ausgedrückt in pH-Einheiten. TG = Trockengewicht.

		Phosphatpuffer 0.1 M $4{,}8.10^6$ Sporen/Kolben				*Tartratpuffer 0.1 M* $3{,}4.10^6$ Sporen/Kolben				*Citratpuffer 0.1 M* $3{,}6.10^5$ Sporen/Kolben			
pH Puffer	Tage	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH
	0	–	–	1.9	–	–	–	2.05	–	–	–	2.05	–
	4	31	16	2.0	0.03	50	21	2.1	0	70	71	2.2	0.09
	5	205	91	2.2	0.11	320	73	2.4	0.1	360	230	2.3	0.1
2.0	6					800	78	2.3	0.1	720	48	2.3	0.12
	7	735	139	2.2	0.15	980	26	2.0	0.1	836	115	1.9	0.09
	8					1000	27	2.1	0.1	905	40	1.9	0.16
	9	870	95	2.4	0.09	950	41	2.8	0.5	961	36	2.1	0.2
	0	–	–	2.4	–	–	–	2.5	–	–	–	2.46	–
	4	156	141	2.8	0.41	175	22	2.6	0	202	117	2.7	0.09
	5	737	129	2.9	0.5	619	31	2.7	0.1	580	149	2.8	0.1
2.5	6					955	37	2.0	0	891	122	2.2	0.16
	7	1000	35	2.2	0.05	1020	8	2.0	0.1	951	42	2.0	0.03
	8					970	35	2.4	0.15	993	11	2.1	0.2
	9	798	26	2.5	0.09	860	16	3.0	0	995	43	2.4	0.33
	0					–	–	2.8	–	–	–	2.97	–
	4					220	41	3.1	0	168	57	3.1	0.04
	5					600	267	3.1	0.05	636	111	3.2	0.11
3.0	6					1020	268	2.4	0.1	930	65	2.5	0.19
	7					1000	28	2.3	0.15	990	64	2.4	0.32
	8					945	103	2.8	1.1	1021	68	2.2	0.05
	9					810	31	3.2	0.3	1036	40	2.5	0.39

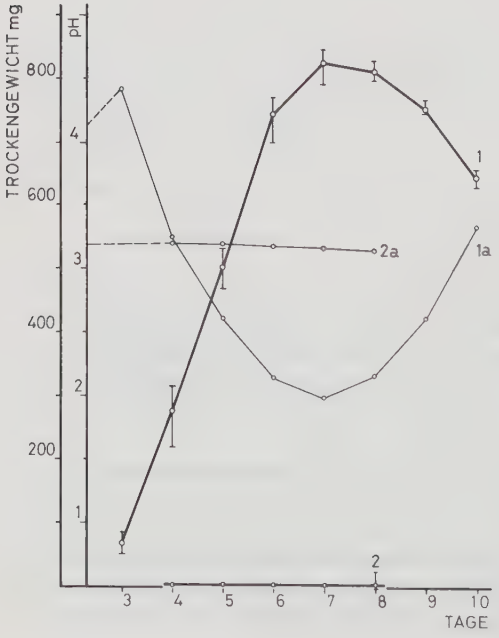
dichte tiefschwarze Sporenrasen. Auch bei Pufferung durch Phosphat tritt bei pH 2.5 starke Sporulierung auf, sie ist jedoch durch ein explosionsartiges Auftreten der Sporen, ungefähr am siebten Tag, gekennzeichnet.

Eine Bildung von **Vitamin B_2** durch *Aspergillus niger* konnte in allen bisher beschriebenen Versuchen beobachtet werden. Die Versuchsbedingungen in der vorliegenden Arbeit sind für die Produktion von Vitamin B_2 durch *Aspergillus niger,* jedoch nicht optimal (Sarasin 1953), und eine quantitative Auswertung war deshalb nicht angezeigt. Qualitativ lassen sich in den Vorversuchen jedoch keine Unterschiede feststellen.

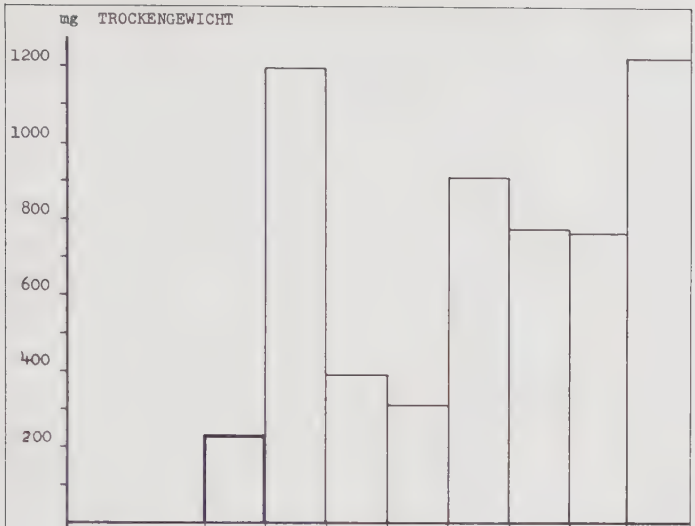
In einer weiteren Versuchserie wurde die Eignung von **Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)** als Puffersubstanz geprüft. Da die pK_a-Werte von EDTA bei ca. 2 und 2.6 liegen, schien eine gute Pufferwirkung im Intervall von pH 2–3 nicht ausgeschlossen. Ausserdem wird diese Substanz in den Hauptversuchen ohnehin in die Nährlösung eingeführt, so dass ein vorläufiger Hinweis auf die Wirkung eines Überschusses an EDTA wünschbar schien. EDTA bleibt bei einem

pH-Wert von 3 und einer maximalen Konzentration von 0.05 Molar gerade noch in Lösung. Figur 7 (Zahlenwerte für EDTA-freien Versuch in Tab. 1b) zeigt das Ergebnis eines Wachstumsversuches bei Anwesenheit von 0.05 M EDTA in der Nährlösung bei pH 3.1, im Vergleich zum Wachstum von *Aspergillus niger* in einer normalen ungepufferten Hewitt-Nährlösung bei gleichem pH-Wert. In der EDTA-haltigen Lösung tritt während acht Tagen kein messbares Wachstum auf, während EDTA im Laufe des Versuchs immer stärker auskristallisiert. Diese Wachstumshemmung scheint auf eine spontane Komplexierung verschiedener, in der Nährlösung befindlicher Spurenelemente zurückgeführt werden zu müssen. Dabei zeigt sich bereits, dass an EDTA komplex gebundene Schwermetalle von *Aspergillus niger* offenbar nicht, oder doch nur sehr schlecht aufgenommen werden können. Ein in Figur 8 (Tab. 4 und 5) dargestellter, orientierender Versuch zeigt die Wirkung von verschiedenen nachträglichen Spurenelement-Zusätzen in die EDTA-haltigen Kolben. Diese Zusätze wurden nach sieben, und in einem Fall nach dreizehn Tagen erfolgloser Kultur (Fig. 7) gemacht, und das Trockengewicht nach zwanzig Tagen Gesamtkulturdauer bestimmt. Im Vergleich zur ursprünglichen Konzentration wurden im Überschuss Calcium, Molybdän, Kupfer, Eisen und von der üblicherweise in der Nährlösung benützten, Zn, Cu, Mn, Co, Ni, und Fe(III) enthaltenden Stammlösung von Mikroelementen, Einzeln und in Kombination zugesetzt.

Alle Schwermetall-Zusätze, ausser Molybdän, bewirken ein sofort einsetzendes starkes Mycelwachstum unter meist normalen Ausbildung einer konidiosporen tragenden Myceldecke und unter starker Vitamin B_2-Bildung. Die Erhöhung der Schwermetallkonzentration von Zn, Cu, Mn, Co, Ni und Fe auf den



Figur 7:
Aspergillus niger:
Wachstum in Nährlösung mit Zusatz von *EDTA*
(EDTA-Dinatriumsalz)
0.05 Molar pH 3.1
0.0102 µg Mo / 50 ml
(Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
1) Kontrolle ohne EDTA
2) EDTA-haltige Lösung (enthält in zunehmendem Mass EDTA-Kristalle)
pH-Kurven: 1a) 2a) respektive.
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite



VERSUCHS - NUMMER	K [1]	1	2	3	4	5	6	7
ZUSAETZE	—	Fe^{III}	Ca^{II}	Mo^{VI}	Ca^{II} SM	Mo^{VI} SM	Ca^{II} Mo^{VI} SM	Fe^{III} Cu^{II}
QUOTIENT [B]/[A] [2]	—	1000	125	100	125 10	100 10	125 100 10	500 6000
ZUSATZ NACH TAGEN	—	7						13
KULTURDAUER TOTAL TAGE	20							
KONZ. EDTA	$5 \cdot 10^{-2}$ MOLAR							

1) K = KONTROLLE OHNE ZUSAETZE
2) VGL. TABELLEN 4 UND 5

Figur 8:
Aspergillus niger:
Wachstumssteigerung durch nachträgliche Zusätze verschiedener Schwermetalle in einzelne Versuchskolben aus Versuch in Fig. 7.

zehnfachen Wert (siehe Tab. 4, Fig. 8/4, 5,6) genügt offenbar, um den hemmenden Effekt des EDTA aufzuheben, wobei der Quotient [M] / [EDTA] aber immer weit unter 1 bleibt. Der Calcium-Zusatz scheint, obwohl die Konzentration gleich der EDTA-Konzentration ist, keinen nennenswerten fördernden Einfluss zu haben.

Tabelle 4:

Molare Konzentrationen der Mikroelemente und von Calcium.
A Konzentration in der Nährlösung nach Hewitt, ursprünglich.
B Konzentration der Zusätze in je 1 Kolben aus Versuch in Fig. 7.

Stammlösung Mikroelemente SM	Konzentration A	Konzentration B	Konzentration B/2
Zn	$6 .10^{-6}$	$6 .10^{-5}$	
Cu	$2.37.10^{-6}$	$2.37.10^{-5}$	
Mn	$1.81.10^{-6}$	$1.81.10^{-5}$	
Co	$3.57.10^{-7}$	$3.57.10^{-6}$	
Ni	$2.5 .10^{-8}$	$2.5 .10^{-7}$	
Fe^{III}	$1.32.10^{-6}$	$1.32.10^{-5}$	
Einzelzugaben			
Mo^{VI}	$2 .10^{-9}$	$2 .10^{-7}$	
Ca	$4 .10^{-4}$	$5 .10^{-2}$	
Fe^{III}	$1.32.10^{-6}$	$1.37.10^{-3}$	$6.85.10^{-4}$
Cu	$2.37.10^{-6}$	$1.56.10^{-2}$	

Tabelle 5:

Zusätze zur Konzentration A, (Tab. 4 / Fig. 8) in je 1 Kolben aus Versuch in Fig. 7, EDTA 5.10^{-2} enthaltend. Gesamtkulturdauer: 20 Tage bei 25°C. TG = Trockengewicht. K = Kontrolle ohne Zusatz.

Versuch Nr.	TG mg	pH	Zusätze Konzentration B	nach Tagen
K	232	3.31	— —	—
1	1209	3.13	Fe^{III} (B)	7
2	392	3.08	Ca	7
3	311	3.34	Mo^{VI}	7
4	911	3.92	Ca SM	7
5	774	4.25	Mo^{VI} SM	7
6	765	4.10	Ca Mo^{VI} SM	7
7	1225	3.06	Fe^{III}(B/2) Cu	13

Hauptversuche

Versuchsbedingungen

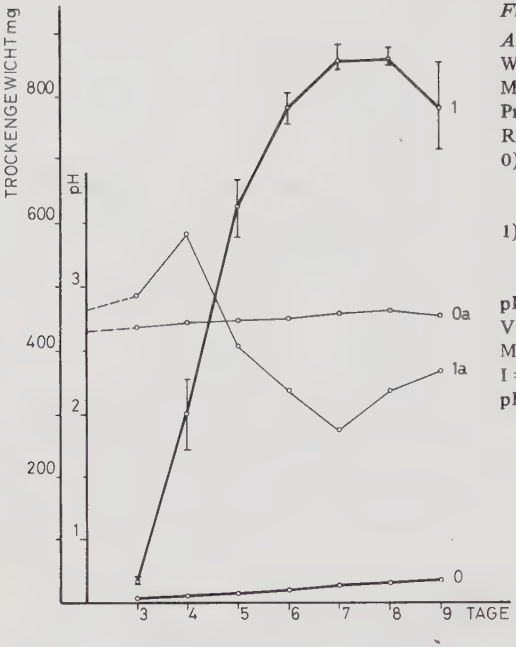
Die Untersuchung der Wirkung von Molybdänverbindungen mit veränderter Koordinationssphäre und unterschiedlicher Oxydationszahl des Molybdäns auf das Wachstum von *Aspergillus niger*, wurde nun in Lösungen und Glasgeräten, die von möglichst allen Molybdän- und sonstigen Metallspuren befreit worden

waren (vgl. Methoden), durchgeführt. Die Versuche wurden in der ungepufferten Nährlösung nach Hewitt (1966), bei einem Anfangs-pH-Wert um 2.5, durchgeführt. Auf die Pufferung wurde deshalb verzichtet, weil einerseits, wie aus den Vorversuchen hervorgeht, eine starke Pufferwirkung bei tiefen pH-Werten den Versuchablauf zu stark verzögert, und andererseits alle, durch die geprüften Puffersubstanzen etwa möglichen Sekundäreinflüsse unerwünscht sind. Dies umso mehr, als die pH-Änderung über den ganzen Versuch bei tiefem Anfangs-pH-Wert in ungepufferten Lösungen nicht wesentlich grösser ist, als in gepufferten Medien (Tab. 2). Eine weitere Schwierigkeit stellt die Entfernung von Metall-Verunreinigungen aus diesen Puffersubstanzen, vor allem die Reinigung von Phosphat dar. Obwohl bei pH 2 als Anfangswert die pH-Änderung während des Versuchs kleiner wäre, wurde pH 2.5 für die Durchführung der Haupversuche gewählt. Dieser pH-Wert entspricht ungefähr dem Eigenwert der Versuchslösung nach der Herstellung aus den gereinigten Stammlösungen. Durch die notwendigen Manipulationen zur genauen pH-Einstellung, wird die Gefahr der Einschleppung neuer Verunreinigungen zu gross. Da bei früheren Versuchen beobachtet worden war, dass der pH-Wert der Lösungen durch die Sterilisation im Autoklaven manchmal noch etwas sinkt, sollte durch die Wahl des pH-Wertes von 2.5 vermieden werden, dass das erforderliche pH-Minimum unterschritten wird.

Zunächst wurden die angewendeten Reinigungsverfahren von Stammlösungen und Glasgeräten geprüft, und eine **Standard-Wachstumskurve** in Abhängigkeit von der Zeit unter diesen „spurenfreien" Verhältnissen, im Vergleich zu einem Kontrollversuch ohne Molybdän-Zugabe, aufgestellt (Fig. 9, Tab. 7). Dem Standardversuch wurde Molybdän als Na_2MoO_4, in der Konzentration 0.01 μg Mo pro 50 ml Nährlösung ($2 \cdot 10^{-9}$ Molar) zugegeben. Dieser Versuch zeigt, dass es mit den angewandten Reinigungsmethoden gelingt, nahezu die letzten Spuren von Molybdän aus der Nährlösung zu entfernen. Das Myceltrockengewicht in der molybdänfreien Lösung beträgt im Zeitpunkt des Wachstumsmaximums für die Lösung mit optimaler Molybdänkonzentration, am achten Tag, nur 4% des Trockengewichtes dieser molybdänhaltigen Lösung. Die Trockengewichtsausbeute in einer solchen „molybdänfreien" Nährlösung ist somit kaum grösser, als der Variationsbreite beim Wachstumsmaximum in der Lösung mit optimaler Molybdänkonzentration entspricht. Die zeitabhängige Wachstumskurve bei 0.01 μg Mo / 50 ml Nährlösung, unter „spurenfreien" Voraussetzungen, zeigt einen normalen, den Standardverhältnissen in ungereinigten Lösungen entsprechenden Verlauf.

Qualitative Beobachtungen

Die makroskopische, rein qualitative Beobachtung der Entwicklung der Myceldecken und der Konidiosporenbildung unter den oben beschriebenen Bedingungen, zeigte eine erstaunliche Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Hewitt und Halla (1951). Da diese Phänomene charakteristisch zu sein schienen und sehr gut reproduzierbar waren, sollen die eigenen Beobachtungen kurz beschrieben werden.



Figur 9:
Aspergillus niger:
Wachstum in Nährlösung, die von Molybdänspuren gereinigt worden ist. Prüfung der Leistungsfähigkeit der Reinigungsmethode.
0) Lösung ohne Molybdänzugabe (Variationsbreite nicht eingezeichnet, da sie sehr gering ist)
1) 0.0103 µg Mo / 50 ml (Na_2MoO_4 2.10^{-9} Molar)
$1{,}5 . 10^6$ Sporen/Kolben
pH: 2.6
Versuchstemperatur: 25° C
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite
pH-Kurven: 0a) 1a) respektive

In Lösungen mit optimalem Molybdängehalt entwickelt sich das Mycel von Anfang an als Decke an der Lösungsoberfläche. Bereits am dritten Tag bildet sich am Kolbenrand ein oberflächlicher zusammenhängender Mycelring und im Zentrum mehrere an der Oberfläche schwimmende Inseln aus. Dieses Mycel zeigt ein gut ausgebildetes, schneeweisses Luftmycel an der Oberseite. Bis zum fünften Tag hat sich meist eine zusammenhängende Myceldecke entwickelt, deren Unterseite an den dicksten Stellen gelb gefärbt ist. Diese Gelbfärbung vertieft sich mit zunehmender Dicke der elastischen Decke, deren Flächenausdehnung vom sechsten Tag an meist grösser ist als die Lösungsoberfläche, und die sich deshalb am Rand aufzuwerfen beginnt. Wenn das Mycelwachstum am siebten oder achten Tag sein Maximum erreicht, wird die Konsistenz der Myceldecke eher steif oder fast brüchig. Im gleichen Zeitpunkt erscheint nun auch die Lösung stark gelb gefärbt. Es darf angenommen werden, dass die Gelbfärbung der Mycelunterseite und der Lösung von **Vitamin B_2** bewirkt wird, das von *Aspergillus niger* gebildet, und vom Zeitpunkt des stärksten Wachstums an auch in die Lösung ausgeschieden wird. Während des Wachstumsrückganges wird die Myceldecke weich und schwammig und zerfällt bei Berührung sehr leicht, was auf eine fortschreitende Autolyse der Hyphen hinweist. Das Filtrat ist in diesem Stadium nicht mehr klar, sondern mehr oder weniger stark getrübt.

Die Bildung der **Konidiosporen** auf der Myceloberfläche kann vom fünften Kulturtag an beobachtet werden. Es treten zunächst sehr zerstreute winzige braune Konidiosporenköpfchen auf. Die Ausbildung eines dichteren Sporenrasens erfolgt zuerst auf den Stellen, wo die Myceldecke am dichtesten ist, also meist ringförmig am Rand, indem sich der Rasen, wie die Myceldecke

selbst, zum Zentrum hin allmählich schliesst. Die Sporenreife, visuell zu erkennen an der Ausbildung eines dichten dunklen Sporenrasens mit grossen Konidiosporenköpfchen, die leicht abfallen, fällt ungefähr mit der Erreichung des Wachstumsmaximums zusammen. In den Versuchen mit Lösungen und Glasgeräten, die nicht speziell von Molybdänspuren gereinigt worden sind, sind die reifen Sporen von *Aspergillus niger* bei der Konzentration von 0.01 µg Mo / 50 ml Nährlösung tiefschwarz gefärbt. Dagegen bleibt die Sporenfärbung in den Versuchen in gereinigten Lösungen bei der gleichen Molybdänkonzentration bei dunkelbraun stehen. Diese Erscheinung wurde schon von Hewitt und Hallas (1951) beobachtet, und lässt sich wohl so erklären, dass die Molybdänkonzentration von 0.01 µg Mo / 50 ml Nährlösungen zwar für das Mycelwachstum, nicht aber für die vollständige Ausbildung und Pigmentierung der Konidiosporen optimal ist. Die geringfügige Konzentrationserhöhung des Molybdäns durch die Verunreinigungen aus dem Glas und den normalen analysenreinen Chemikalien genügt offenbar schon, um diesen Unterschied auszugleichen.

Das **Molybdän-Mangelmycel**, das sich in geringem Ausmass im Kontrollversuch ohne Molybdänzugabe bildet, ist insofern sehr charakteristisch, als es sich dabei um eine ausgesprochen submers wachsende gallertige, dünne und weisse Haut handelt. Bevor diese Mycelhaut ca. am fünften Tag zusammenhängend wird, sind nur weissliche, untergetauchte Flocken zu beobachten. Mit der Zeit können sich sehr kleine, vereinzelte, etwas Luftmycel tragende Inseln an der Oberfläche bilden, die unter Umständen sogar einzelne, winzige Sporen tragen können. Vitamin B_2-Bildung kann nicht beobachtet werden. Über den mikroskopischen Aspekt von Molybdänmangel-Hyphen, im Vergleich zu normal ausgebildeten, liegen keine eigenen Untersuchungen vor. Es sei aber auf die diesbezüglichen Abbildungen in der Arbeit von Bussler (1970) hingewiesen.

Qualitativ wie auch weitgehend quantitativ, ist die Wirkung von Molybdat und Mo^{VI}-EDTA gleich. Zur Charakteristik des Molybdänmangel-Mycels, als vor allem submers wachsender Mycelhaut bei gering ausgebildetem Oberflächen- und Luftmycel, ist in bezug auf die Versuche mit Mo^{V}-EDTA un Mo^{III}-EDTA eine auffallende Beobachtung zu machen. Bei nur teilweisem Molybdänmangel verändert sich das Verhältnis zwischen dem submersen und dem oberflächlichen Mycelanteil graduell. Wie in der Diskussion ausführlich dargelegt werden wird, steht Molybdän dem Versuchorganismus, wenn es in der Form der oben erwähnten Chelate geboten wird, nur in ungenügender Konzentration zur Verfügung. In den Zellen herrscht infolgedessen ein gewisser Mangel an aktivem Molybdän. Unter solchen Mangelbedingungen zeigt nun die Mycelentwicklung ein Stadium, während der mittleren Wachstumsphase, in welchem die dünne Oberflächendecke die ganze Lösungsoberfläche bedeckt. Bei weiterem Wachstum, statt sich nach oben und unten zu verdichten, breitet sie sich weiter flächig aus, indem sehr langgestreckte Lufthyphen ringförmig an der Kolbenwand empor zu wachsen beginnen. Bei einem Molybdänmangel in der Lösung, hervorgerufen durch tiefe Molybdat-Konzentration, konnte diese Erscheinung jedoch nicht beobachtet werden.

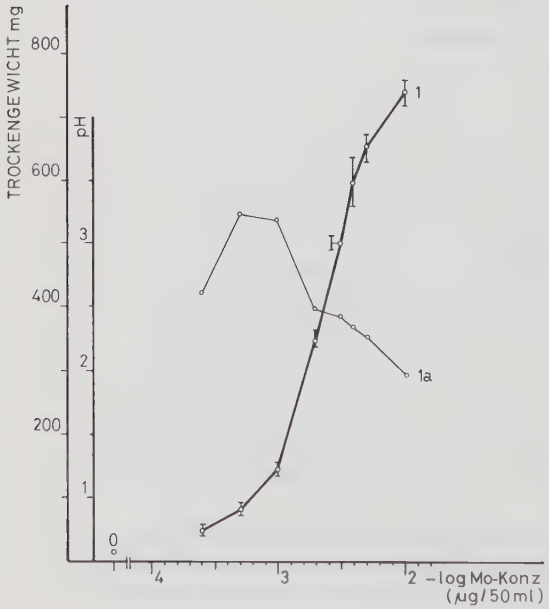
Reife Sporen werden auch in den Nährmedien, die Mo^{V}-EDTA oder Mo^{III}-EDTA als Molybdänquelle enthalten, gebildet. Es fällt jedoch auf, dass die Sporenbildung desto später einsetzt, je grösser der „physiololgische" Molybdänmangel

ist. Ein explosionsartiges Auftreten eines dichteren Sporenrasens im Zeitpunkt des maximalen Trockengewichts, fällt besonders für Mo^{V}-EDTA-haltige Lösungen auf.

Es ist weiterhin eigentümlich, dass in den Versuchen mit Mo^{V}-EDTA und Mo^{III}-EDTA als Molybdänquellen, jede Bildung von Vitamin B_2 ausbleibt, auch im Zeitpunkt des jeweiligen Wachstumsmaximums. Im Falle von Molybdat oder Mo^{VI}-EDTA tritt bei entsprechender Trockengewichtsausbeute bereits ausgeprägte Vitamin B_2-Bildung auf.

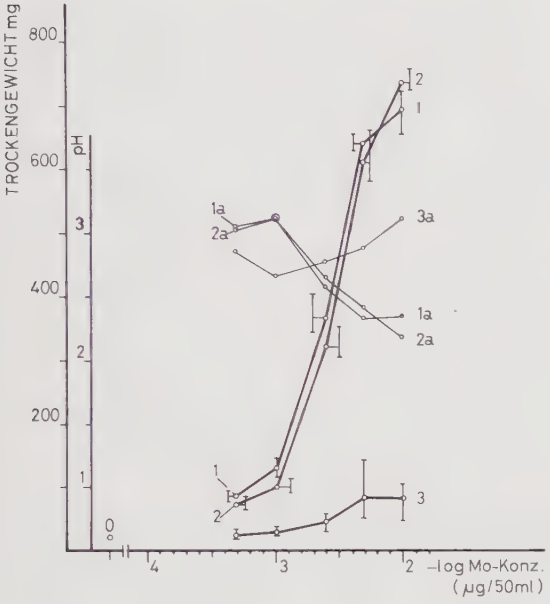
Konzentrationsabhängigkeit des Mycelwachstums

In weiteren Versuchen wurde die Abhängigkeit des Wachstums von *Aspergillus niger* von der **Molybdänkonzentration** in der eigenen Versuchsanordnung geprüft, und mit den Ergebnissen in der Literatur (Nicholas und Fielding 1951, Hewitt und Hallas 1951, Nicholas 1952, Hewitt 1966) verglichen. Der Konzentrationsbereich wurde nach Hewitt (1966), zwischen $2.5 \cdot 10^{-4}$ µg Mo / 50 ml und 10^{-2} µg Mo / 50 ml Nährlösung (5.10^{-11} M – 2.10^{-9}M) gewählt. Die Kulturdauer betrug jeweils 6 Tage. Dieser Zeitpunkt ist für die Wachstumsmessung insofern günstig, als er noch in die Phase des exponentiellen, also sehr aktiven Wachstums fällt, dabei dem Maximum aber schon so nahe kommt, dass die Streuung der Einzelwerte mit einer Varianz von 3% genügend klein ist (siehe Fig. 9, Tab. 7 für Molybdat). Die detaillierte Untersuchung des Wachstums in Abhängigkeit von der Molybdänkonzentration mit Hilfe einer Konzentrationsreihe, wenn Molybdän als Polymolybdat in der Lösung vorliegt, ergibt im kritischen Konzentrationsbereich eine ausgeprägte S-Kurve (Fig. 10, Tab. 6).



Figur 10:
Aspergillus niger:
Wachstum in Abhängigkeit von der Molybdänkonzentration.
0) Kontrolle ohne Molybdän-Zugabe
1) Trockengewicht
1a) pH-Kurve
Molybdän als Na_2MoO_4 zugegeben.
Anfangs-pH: 2.6
$2{,}2 \cdot 10^6$ Sporen/Kolben
(50 ml Nährlösung)
Kulturdauer: 6 Tage
Versuchstemperatur: 25°C
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

Dieses Ergebnis stimmt mit demjenigen von Nicholas und Hewitt überein. Eine solche Kurvenform scheint auf eine echte Abhängigkeit des Mycelwachstums von der Molybdänkonzentration im Sinne einer chemischen Massenwirkung hinzuweisen, wie in der Diskussion näher ausgeführt werden soll.



Figur 11:
Aspergillus niger:
Wachstum in Abhängigkeit von der Molybdänkonzentration und der Molybdänverbindung.
5,8 . 10^6 Sporen/Kolben
(50 ml Nährlösung)
Anfangs-pH: 2.5
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
0) Kontrolle ohne Molybdänzugabe
1) Na_2MoO_4
2) Mo^{VI}-EDTA
3) Mo^{V}-EDTA
pH-Kurven: 1a) 2a) 3a) respektive
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

Unter diesem Gesichtspunkt wurden auch die Verbindungen Mo^{VI}-EDTA und Mo^{V}-EDTA, im Vergleich zu Molybdat geprüft. Die Resultate sind in Figur 11 (Tab. 6) dargestellt, und zeigen einerseits, dass die Wachstumskurven in jedem fall S-förmig bleiben, und andererseits, dass die Wirkung von Molybdat und Mo^{VI}-EDTA auf das Wachstum von *Aspergillus niger* nicht signifikant verschieden zu sein scheint. Hingegen ist die Trockengewichtsausbeute im Falle von Mo^{V}-EDTA als Molybdänquelle, verglichen mit den durch die andern beiden Verbindungen erzielten Werten, empfindlich geringer. Daraus muss man zunächst schliessen, dass offenbar die Konzentration an „biochemisch aktivem" Molybdän, wenn es als Mo^{V}-EDTA Chelat geboten wird, für normales Mycelwachstum ungenügend ist.

Die Zugänglichkeit der Molybdänchelate Mo^{VI}-EDTA, Mo^{V}-EDTA und Mo^{III}-EDTA für *Aspergillus niger,* und damit ihre Wirkung auf dessen Wachstum, wurde ferner in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Diese Wachstumskurven wurden mit der Standard-Kurve von Molybdat verglichen. Es wurde die, für die Wirkung von Molybdat optimale Molybdänkonzentration von 0.01 µg Mo / 50 ml Nährlösung gewählt. (Fig. 12, Tab. 7).

Der Verlauf der Wachstumskurve für **Mo^{VI}-EDTA** entspricht der Charakteristik der Standard-Wachstumskurve für Molybdat als Molybdänquelle, nämlich:

Tabelle 6:

Wachstum von *Aspergillus niger* in Abhängigkeit von der Molybdänkonzentration und der Molybdänverbindung. Kulturdauer: 6 Tage. Versuchstemperatur: 25 °C. Mittelwerte aus N = 3. Vb = Variationsbreite: Differenz zwischen dem maximalen und minimalen Wert. TG = Trockengewicht.

A: Werte zu Fig. 10

Sporendichte: 2.2 . 10^6 Sporen/Kolben
pH der Lösung: 2.63

µg Mo / 50 ml		Na_2MoO_4		
berechnet	Einwaage	TG mg	Vb mg	pH
0	0	18	4	2.7
0.00025	0.000257	48	8	2.6
0.0005	0.00051	83	6	3.2
0.001	0.00103	146	17	3.2
0.002	0.00206	354	20	2.5
0.003	0.00309	503	114	2.4
0.004	0.00412	592	78	2.3
0.005	0.00515	653	43	2.3
0.01	0.0103	740	38	1.9

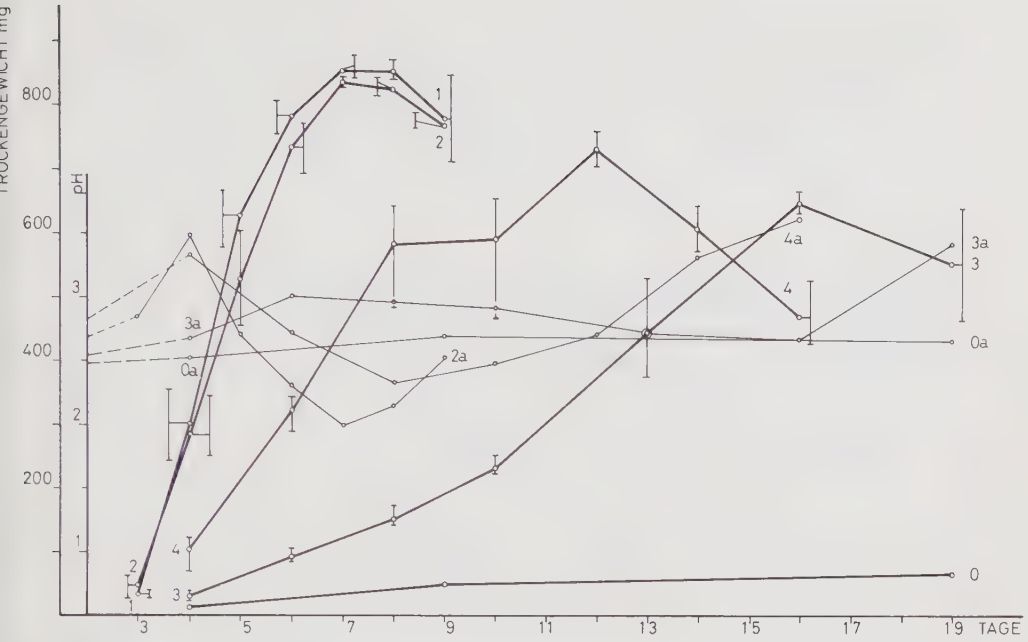
B: Werte zu Fig. 11

Sporendichte: 5.8.10^6 Sporen/Kolben pH der Lösung: 2.46

µg Mo / 50 ml		Na_2MoO_4			Mo^{VI}-EDTA				Mo^{V}-EDTA			
berechnet	Einwaage	TG mg	Vb mg	pH	µgMo/50ml Einwaage	TG mg	Vb mg	pH	µgMo/50ml Einwaage	TG mg	Vb mg	pH
0	0.00000	20	9	2.6	0	20	9	2.6	0	20	9	2.6
0.0005	0.00051	85	14	3.0	0.00049	78	14	3.0	0.000506	26	10	2.7
0.001	0.00103	131	32	3.1	0.00099	102	19	3.1	0.00101	30	13	2.7
0.0025	0.00257	367	64	2.6	0.00248	322	30	2.6	0.00253	44	16	2.8
0.005	0.00515	642	22	2.3	0.00496	614	121	2.4	0.00506	885	92	2.9
0.01	0.0103	696	73	2.4	0.0099	739	33	2.2	0.0101	81	60	3.1

Sporenkeimung während der ersten drei Tage und erstmals messbares Mycelwachstum am dritten Kulturtag. Unmittelbar darauf einsetzendes, exponentielles Wachstum, das mit unverminderter Geschwindigkeit bis zum sechsten Tag anhält, Erreichung des Maximums zwischen dem siebten und achten Tag und daran anschliessender Wachstumsrückgang, unter Autolyse des Mycels. Die Trockengewichtswerte liegen für Mo^{VI}-EDTA wenig tiefer als für Molybdat. Der Unterschied wurde aber als nicht signifikant angesehen.

Die Wachstumskurve für **Mo^{V}-EDTA** weicht nun aber in ihrer Form insofern entscheidend von der Standard-Kurve ab, als nach verzögerter Sporenkeimung und erst am vierten Tag möglicher erster Trockengewichtsbestimmung, eine



Figur 12:

Aspergillus niger:
Einfluss verschiedener Molybdänverbindungen auf das Wachstum.
$7{,}7 \cdot 10^6$ Sporen/Kolben (50 ml Nährlösung)
Anfangs-pH: 2.5
Versuchstemperatur: 25°C
Trockengewicht:
0) Kontrolle ohne Molybdänzugabe
1) Na_2MoO_4 (2.10^{-9} Molar) 0.0103 µg Mo / 50 ml
2) Mo^{VI}-EDTA (2.10^{-9} Molar) 0.0099 µg Mo / 50 ml
3) Mo^{V}-EDTA (2.10^{-9} Molar) 0.0101 µg Mo / 50 ml
4) Mo^{III}-EDTA (2.10^{-9} Molar) 0.0100 µg Mo / 50 ml
pH-Kurven: 0a) 1a) 2a) 3a) 4a) respektive
Mittelwerte aus N = 3
I = Variationsbreite

ausgeprägte Beschleunigungsphase, mit geringer Steigung der Kurve zwischen dem 4. und 10. Tag auftritt. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird erst nach dem 10. Tag, bis zur Erreichung des Maximums am 16. Kulturtag grösser. Das Wachstum, gemessen als Myceltrockengewicht, ist viel geringer, als für die Mo^{VI}-Verbindungen. Der maximale Trockengewichtswert für Mo^{V}-EDTA beträgt nur 78% des Wertes für Mo^{VI}-EDTA.

Die Wirkung von **Mo^{III}-EDTA** scheint zwischen denjenigen von Mo^{VI}-EDTA und Mo^{V}-EDTA zu liegen. Die Kurvenform ist nicht durch ein schleppendes Mycelwachstum verändert, sondern der Versuchsablauf wird, auf Grund der kleineren Myceltrockengewichtwerte und der dadurch verringerten Wachstums-

geschwindigkeit, gemessen als Mycelzuwachs pro Tag während des steilsten Wachstumsanstieges, verzögert. Das Maximum wird am 12. Kulturtag mit einem Wert erreicht, der 80% des maximalen Trockengewichtes für Mo^{VI}-EDTA entspricht. An der Wachstumskurve bei Mo^{III}-EDTA als Molybdänquelle, ist ausserdem auffallend, dass zwischen dem achten und dem zehnten Tag eine stationäre Phase eintritt, während derer die Variationsbreite der Einzelwerte ausserordentlich

Tabelle 7:

Einfluss verschiedener Molybdänverbindungen auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Molybdän 2.10^{-9} Molar. Versuchstemperatur: 25° C. Mittelwerte aus N = 3.
Vb = Variationsbreite: Differenz zwischen dem maximalen und minimalen Wert.
Vb der pH-Werte ausgedrückt in pH-Einheiten.
V = Varianz. s = Streuung. TG = Trockengewicht.

A zu Fig. 9	Sporendichte: $1.5.10^6$ Sporen/Kolben (50 ml Nährlösung)								
	Na_2MoO_4 (0.0103 µg Mo / 50 ml)					Kontrolle ohne Molybdän			
Tage	TG mg	s	V %	pH	Vb pH	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH
0	–	–	–	2.59	–	–	–	2.57	–
3	35	3.46	8.9	2.9	0.12	8	2	2.7	0.02
4	300	56.12	18.7	3.4	0.43	11	4	2.7	0.02
5	629	47.43	7.5	2.5	0.65	16	8	2.7	0
6	782	23.70	3	2.2	0.07	22	4	2.7	0.05
7	855	21.21	2.5	1.9	0.12	28	6	2.8	0.05
8	858	14.52	1.6	2.2	0.3	33	8	2.8	0.06
9	780	68.11	8.6	2.3	0.88	38	0	2.8	0.05

B zu Fig. 12	Sporendichte: $7.7.10^6$ Sporen/Kolben (50 ml Nährlösung)													
	Mo^{VI}-EDTA 0.0099 µg Mo / 50 ml				Mo^{V}-EDTA 0.0101 µg Mo / 50 ml				Mo^{III}-EDTA 0.0100 µg Mo / 50 ml				Kontrolle ohne Molybdän	
	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH	TG mg	Vb mg	pH	Vb pH	TG mg	pH
0	–	–	2.43	–	–	–	2.43	–	–	–	2.43	–	–	2.43
3	44	35	2.8	0.31										
4	286	93	3.5	0.39	30	7	2.7	0.07	101	52	3.3	0.71	10	2.5
5	529	149	2.7	0.34										
6	736	79	2.3	0.30	95	20	3.0	0.17	324	55	2.7	0.11		
7	836	10	2.0	0.12										
8	834	24	2.1	0.19	157	24	3.0	0.05	585	149	2.3	0.4		
9	779	24	2.5	0.21									52	2.7
10					236	25	2.9	0.06	592	192	2.5	0.38		
12									736	52	2.7	0.2		
13					445	276	2.7	0.41						
14									610	73	3.4	0.23		
16					654	32	2.7	0.43	476	93	3.6	0.11		
19					560	179	3.4	0.7					66	2.7

gross wird, worauf aber ein erneuter steiler Wachstumsanstieg bis zur Erreichung des Maximalwertes erfolgt. Es ist allerdings nicht möglich, auf Grund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Messwerte zu entscheiden, ob es sich bei dieser Schulter in der Wachstumskurve nur um eine zufällige Erscheinung handelt, oder ob ihr eine grundlegende Bedeutung zukommt.

Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit während der jeweils steilsten Phase, gemessen als Mycelzuwachs pro Tag (Δ mg Trockengew./Tag) ergibt für Mo^{V}-EDTA 29%, und für Mo^{III}-EDTA 54% des gleich 100% gesetzten Wertes für Mo^{VI}-EDTA.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse über die Beeinflussung des Mycelwachstums von *Aspergillus niger* durch Molybdänverbindungen mit veränderter Koordinationssphäre und unterschiedlicher Oxydationszahl des Molybdäns, im Vergleich zur Wirkung von Molybdat, muss vor allem die Stabilität der geprüften Verbindungen sowie die Form, in welcher sie unter den herrschenden Versuchsbedingungen in der Lösung vorliegen, berücksichtigt werden. Im Sinne einer Analyse der zu unterscheidenden Vorgänge bei der Wirkung von Molybdän auf das Wachstum von *Aspergillus niger,* soll eine Deutung der hier vorliegenden Versuchsergebnisse in der Diskussion versucht werden.

Der Verlauf der pH-Kurven während der verschiedenen Hauptversuche (Fig. 9–12) weist noch einmal darauf hin, dass die starke Senkung des pH-Wertes während der Phase des stärksten Wachstums auf Säureproduktion durch normal wachsendes Mycel zurückzuführen ist. Bei geringem Mycelwachstum bleibt der pH-Wert annähernd konstant, oder steigt eher leicht an. Ausserdem scheint die Säurebildung der Mycelmenge proportional zu sein.

Diskussion

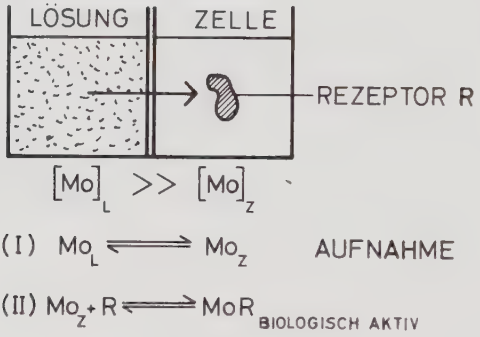
Die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen, dass das Wachstum von *Aspergillus niger* unter den gewählten Versuchsbedingungen, wobei dem tiefen pH-Wert des Mediums (pH 2,5) entscheidender Einfluss zugemessen werden muss, von der Art der Molybdänquelle abhängt. Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die starke Verminderung des Mycelwachstums im Falle von Mo^{V}-EDTA und Mo^{III}-EDTA, verglichen mit Mo^{VI}-EDTA, eine Folge der verminderten Oxydationszahl oder aber der veränderten Koordinationssphäre des Molybdäns sein kann, muss vor allem die Komplexstabilität, die Komplexzerfallsgeschwindigkeit und die Redoxstabilität der verwendeten Chelate berücksichtigt werden.

Der Diskussion der einzelnen Resultate seien zunächst einige allgemeine Erwägungen über den Wirkungsmechanismus des Spurenelementes Molybdän vorausgeschickt.

Eine Interpretation der Wirkung einer Substanz in der Nährlösung auf das Wachstum des Versuchsorganismus bedingt notwendigerweise eine Zerlegung des Phänomens in Teilvorgänge. Für die Überführung des frei in der Nährlösung vorliegenden Molybdäns zum reaktionsbereiten Molybdänenzym, müssen mindestens zwei Teilprozesse unterschieden werden, nämlich (I) der Transport

in die Zelle, und (II) die Bildung von aktivem Enzym aus Molybdän und dem metallfreien Enzym, beziehungsweise dem Enzym-Substratkomplex.

Zunächst liegen in einer Versuchsanordnung, nachdem die Sporen von *Aspergillus niger* gekeimt sind, die Verhältnisse so, dass sich die Pilzzellen in einer Molybdän-haltigen Lösung von der Konzentration $[Mo]_L$ befinden. Diese Lösung soll, wie die schematische Figur andeutet, ein grosses Reservoir darstellen. Unter diesen Bedingungen ist $[Mo]_L$ sehr viel grösser als die Molybdänkonzentration in der Zelle $[Mo]_Z$. Da das in die Zelle gelangende Molybdän einerseits wieder zurück diffundieren kann, und andererseits mit dem Enzym, beziehungsweise mit dem Enzym-Substratkomplex reagiert, stellt sich nach bestimmter Zeit ein Gleichgewicht zwischen $[Mo]_L$ und $[Mo]_Z$ her (I). Das aktive Enzymzentrum soll hier generell als Rezeptor R bezeichnet werden (II). MoR wäre das reaktionsbereite Enzym.



Gesamthaft liegt nun folgende Reaktionskette vor:

$$(1) \quad Mo_L \rightleftharpoons Mo_Z + R \rightleftharpoons MoR \rightharpoonup \text{Metabolismus}$$

Wenn das Molybdän, das in der Zelle an den Rezeptor gebunden wird, aus der Lösung stetig nachgeliefert wird, wird $[Mo]_Z$ nach bestimmter Zeit annähernd konstant, und wenn (I) als Diffusionsvorgang betrachtet werden kann und ausserdem $[Mo]_Z$ stets klein bleibt, ist $[Mo]_Z \sim [Mo]_L$.

Wenn diese Vorstellung richtig, und wenn ausserdem MoR für das Wachstum verantwortlich ist, stellt dessen Konzentration [MoR] ein lineares Mass für das Wachstum W dar.

Wird nun das Wachstum W als Funktion der Molybdänkonzentration in der Lösung $[Mo]_L$ aufgetragen, und ergibt $W = f\,[Mo]_L$ eine S-förmige Kurve, so ist damit ein sicherer Hinweis dafür gefunden, dass Molybdän das Wachstum im Sinne einer chemischen Massenwirkung beeinflusst.

Das Massenwirkungsgesetz angewendet auf Mo_Z und R lautet:

$$(2) \quad \frac{[MoR]}{[Mo]_Z * [R]} = K$$

K ist die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion von Mo_Z mit dem Rezeptor R.

Für die totale Rezeptorkonzentration $[R]_{total}$, gilt die Bilanz

$$(3) \quad [R]_{total} = [R] + [MoR]$$

$$(4) \quad [R] = [R]_{total} - [MoR]$$

(4) in die Massenwirkungsgleichung eingesetzt, führt zu:

$$(5) \quad \frac{[MoR]}{[Mo]_Z * ([R]_{total} - [MoR])} = K$$

$$(6) \quad \frac{[MoR]}{[Mo]_Z} = K * [R]_{total} - K * [MoR]$$

$$(7) \quad \frac{[MoR]}{[Mo]_Z} + K * [MoR] = K * [R]_{total}$$

$$(8) \quad [MoR]\left(\frac{1}{[Mo]_Z} + K\right) = K * [R]_{total}$$

Für [MoR] soll jetzt die proportionale Grösse W eingesetzt werden

$$(9) \quad W = \chi [MoR]$$

$$(10) \quad \boxed{W = \chi \frac{K * [R]_{total}}{\frac{1}{[Mo]_Z} + K}}$$

Aus (10) geht ohne weiteres hervor, dass bei grosser $[Mo]_Z$ das Wachstum W gegen einen oberen Grenzwert geht. Denn wenn $[Mo]_Z$ gross ist, wird $\frac{1}{[Mo]_Z} \ll K$ und folglich $W = \chi [R]_{total}$.

Ferner wird das Gleichgewicht (II) vollständig auf die rechte Seite verschoben, und wenn die totale Rezeptorkonzentration im Versuch konstant wird, geht W gegen einen konstanten Wert. Bei kleiner $[Mo]_Z$ ist andererseits $\frac{1}{[Mo]_Z} \gg K$ und dann wird

$$W = \chi * K * [R]_{total} * [Mo]_Z.$$

Tatsächlich stellt Gleichung (10) eine S-Kurve dar und kann somit mindestens qualitativ die in unseren Versuchen gefundene Konzentrationsabhängigkeit des Mycelwachstums erklären. Es wäre im Prinzip möglich, aus der Gleichung (10) die Gleichgewichtskonstante K für die Reaktion zwischen Mo_Z und R, also für den Vorgang (II) zu bestimmen. Die Molybdänkonzentration in der Zelle $[Mo]_Z$ und die Rezeptorkonzentration in der Zelle $[R]_{total}$ sind jedoch unbekannt. Da im allgemeinen Diffusionsvorgänge sehr langsam, und andererseits Komplexbildungsreaktionen rasch sind, dürfte (I) im ganzen Geschehen als geschwindigkeitsbestimmend angesehen werden.

Daraus folgt, dass in den vorliegenden Versuchen durch die Messung des Wachstums vor allem der Transportschritt (I), also die Aufnahme des Molybdäns aus der Lösung durch *Aspergillus niger,* untersucht worden ist. Das beobachtete unterschiedliche Wachstum, entsprechend den verschiedenen Molybdänquellen, ist demnach nicht Ausdruck der biochemischen Aktivität der Molybdän-Partikeln auf Grund ihrer unterschiedlichen Oxydationsstufe. Diese Wachstumsunterschiede drücken lediglich aus, ob $[Mo]_Z$ in der Gleichung (I) genügend gross war, um die für normales Wachstum erforderliche Konzentration an MoR bewirken zu können. Es stellt sich jetzt die Frage, wie das Molybdän unter den herrschenden Versuchsbedingungen in der Lösung überhaupt vorliegt, und inwiefern ein Durchtritt dieses jeweiligen Molekül-Ions durch die Zellmembran, oder aber die Dissoziation der Molybdän-Partikel aus einer komplexen Verbindung innerhalb der Zelle, überhaupt möglich ist.

Über die Form, in der Mo^{VI} in schwach saurer Lösung vorliegt, herrscht noch weitgehend Unklarheit (vgl. Cotton und Wilkinson 1962). Mit einiger Sicherheit glaubt man im pH-Gebiet 5–6 ein heptamer kondensiertes Molybdation nachgewiesen zu haben:

$$7\ MoO_4^{2-} + 8\ H^+ \rightleftharpoons Mo_7O_{24}^{6-} + 4\ H_2O$$

In stärker saurer Lösung bildet sich ein Oktamolybdat von der Zusammensetzung $Mo_8O_{26}^{4-}$ und vermutlich noch höher kondensierte Polymolybdate.

In jedem Fall handelt es sich um voluminöse Ionen mit relativ hoher negativer Ladung, von denen kaum angenommen werden darf, dass sie unverändert durch die Zellmembran hindurchtreten können. Es muss vielmehr vermutet werden, dass der Mo^{VI}-Aufnahme durch die Zelle eine Abdissoziation von mononuklearen MoO_4^{2-} vorausgehen muss. Es konnte daher mit Recht erwartet werden, dass unter Umständen ein mononuklear komplexiertes Mo^{VI} als Molybdänquelle im Nährmedium die Wachstumsrate erhöht. Wie aber die Versuche, dargestellt in den Figuren 11 und 12, zeigen, ist dies nicht der Fall.

Struktur und Zusammensetzung der Mo^{VI}- und Mo^{V}-EDTA Chelate in Lösung sind ebenfalls bisher nicht mit Sicherheit bestimmt worden. Pecsok und Sawyer (1956) beschreiben die Bildung von definierten und kristallisierten Festkörpern von der Zusammensetzung: $Na_4Mo_2O_{14}H_{12}C_{10}N_2 \cdot 8\ H_2O$ und $Na_2Mo_2O_{12}H_{12}C_{10}N_2 \cdot H_2O$, in welchen ein EDTA je zwei Mo^{VI} bzw. Mo^{V} bindet. Über die Stabilität solcher Chelate in wässeriger Lösung finden sich nur spärliche Angaben. Sajo (1957) gibt für die Bildung eines mononuklearen Mo^{VI}-Chelats bei ca. pH 5 eine Stabilitätskonstante von etwa 10^{12} an. Da

aber der Bindungszustand des Mo^{VI} unsicher ist, kann es sich hierbei um eine pH-abhängige Konstante handeln. Wahrscheinlich werden bei der Komplexbildungsreaktion von Molybdat mit EDTA (als vierprotonige Säure mit YH_4 abgekürzt) vom Molybdation ein oder zwei O^{2-} abgelöst. Da EDTA bei pH 5 als YH_2^{2-} vorliegt, muss diese Reaktion wie folgt formuliert werden:

$$MoO_4^{2-} + 2\,H^+ + YH_2^{2-} \rightleftharpoons MoO_2Y^{2-} + 2\,H_2O$$

Eine Extrapolation der Gleichgewichtsmessungen von Sajo ist daher unsicher. Einerseits ist bei tieferem pH die Konzentration an vollständig dissoziiertem Komplexliganden Y^{4-} geringer, aber andererseits ist die Teilreaktion

$$MoO_4^{2-} + 4\,H^+ \rightleftharpoons MoO_2^{2-} + 2\,H_2O$$

begünstigt. Die von Sajo bestimmte Konstante kann somit dennoch als Richtwert für den ganzen schwach sauren pH-Bereich genommen werden.

Berücksichtigt man nun, dass entsprechend den beiden letzten Säuredissoziationskonstanten von EDTA (ca. 10^{-6} und 10^{-10}) bei pH 5 die Konzentration an vollständig dissoziiertem Aethylendiamintetraacetat Y^{4-} ca. 10^{-6}. $[EDTA]_{tot}$ beträgt, so ergibt sich für die scheinbare Komplexstabilitätskonstante:

$$10^{-6} = \frac{[Mo^{VI}EDTA]}{[Mo^{VI}] \cdot [EDTA]}$$

Dieser Ausdruck gestattet nun leicht abzuschätzen, wie stark in den Nährlösungen das Mo^{VI}EDTA Chelat dissoziiert war. Bei einer Totalkonzentration an Mo^{VI} von ca. 10^{-9} Mol/Lt ergibt sich danach eine Chelatkonzentration von etwa 10^{-12} Mol/Lt. Das bedeutet, dass der ursprünglich in fester Form zugegebene Mo^{VI}-EDTA Komplex praktisch vollkommen dissoziiert ist. Dies erklärt, warum die Wachstumskurven der Versuche mit Natriummolybdat und Mo^{VI}-EDTA sich bis auf unsignifikante Abweichungen decken.

Über die Stabilität des Mo^{V}-EDTA Chelates in Lösung finden sich keine Zahlenangaben. (Vgl. „Stability Constants of Methylene Complexes", Ed. The Chemical Society, London 1964). Nach den Versuchen von Pecsok und Sawyer muss jedoch geschlossen werden, dass es sich im Gegensatz zum Mo^{VI}-EDTA Komplex um eine ausserordentlich stabile Partikel handelt. Nicht komplexiertes Mo^{V} wird in luftgesättigter Lösung in wenigen Minuten zur VI-Stufe aufoxydiert. Lösungen von Mo^{V}-EDTA hingegen bleiben über Wochen stabil. Diese extreme Redoxstabilität lässt auf eine kinetisch inerte Partikel schliessen. Dies würde erklären, warum in den Versuchen mit Mo^{V}-EDTA nur geringes Wachstum festgestellt werden konnte. Selbst wenn der Komplex als ganzes aufgenommen werden könnte, ist seine Dissoziation in der Zelle auf Grund seiner hohen Stabilität offenbar nur sehr langsam und in sehr beschränktem Ausmass möglich.

Ebenfalls ungenügend sind bisher die Komplexbildungsreaktionen von Mo^{III} untersucht worden. Ein Festkörper von Mo^{III}-EDTA lässt sich nicht fassen. Lösungen von Mo^{III}-EDTA können aber relativ leicht durch Reduktion von

Mo^{VI}-EDTA mit Zinkamalgam hergestellt werden (Palmer 1954 p. 404). Sie lassen sich spektrophotometrisch gut charakterisieren und sind relativ gut redoxstabil. In luftgesättigten Lösungen werden sie langsam zu Mo^{V}-EDTA aufoxydiert. Quantitative Angaben über die Stabilität von Mo^{III}-EDTA sind bisher nicht gemacht worden. Zur Abschätzung der Lösungsstabilität kann man jedoch die Metallionen Fe^{III} und V^{III} zum Vergleich heranziehen. Demnach dürfte die Stabilitätskonstante für Mo^{III}-EDTA etwa 10^{25} betragen. Berücksichtigt man, dass bei pH 3 die Konzentration an vollständig dissoziiertem Aethylendiamintetraacetat 10^{-10}. $[EDTA]_{tot}$ beträgt, so erhält man für dieses Milieu den Ausdruck:

$$10^{15} = \frac{[Mo^{III}EDTA]}{[Mo^{III}] \cdot [EDTA]}$$

Bei einer Totalkonzentration an Mo^{III} von ca. 10^{-9} Mol/Lt, wie sie in den Wachstumsversuchen etwa angewandt worden war, errechnet man somit für die Konzentration an dissoziierten Partikeln Mo^{III} und freiem EDTA den Wert von etwa 10^{-12} Mol/Lt. Dies besagt, dass auch in extrem grosser Verdünnung der Komplex praktisch vollständig undissoziiert vorliegt. Damit ist weiterhin plausibel gemacht, warum bei Verwendung von Mo^{III}-EDTA als Molybdänquelle, das Wachstum stark verzögert wird.

Die Tatsache, dass Mo^{III}-EDTA stärkeres Wachstum bewirkt, als Mo^{V}-EDTA, lässt sich nicht ohne weiteres erklären.

Die nächstliegende Möglichkeit wäre, dass Mo^{III}-EDTA in der Nährlösung partiell zu Mo^{VI}-EDTA oxydiert wird, wodurch das beobachtete Wachstum, auf Grund der Instabilität des Mo^{VI}-EDTA Komplexes also auf MoO_4^{2-} zurückzuführen wäre. Diese Hypothese wird aber durch die oben erwähnte Tatsache widerlegt, dass Mo^{III}-EDTA in luftgesättigter Lösung zum stabilen Mo^{V}-EDTA, und nicht zu Mo^{VI}-EDTA oxydiert wird. Zwischen den im folgenden angedeuteten Erklärungen, kann vorerst nicht entschieden werden:

(1) Die Stabilität des Mo^{III}-EDTA Komplexes ist nach den vorangegangenen Ausführungen vermutlich geringer, als diejenige von Mo^{V}-EDTA, d.h. es wird trotz allem ein gewisser Anteil an Molybdänpartikeln durch Dissoziation aus dem Komplex frei, und damit dem Mycel zugänglich.

(2) Andererseits ist es möglich, dass wegen der kleineren negativen Ladung des in der Lösung vorliegenden Mo^{III}-EDTA, für dessen Formel in Analogie zu Fe^{III} und V^{III}, MoY^{-} angenommen werden muss, der Durchtritt des undissoziierten Chelates begünstigt wäre.

Über die Aktivität von Mo^{III} in bezug auf eine Reaktion mit einem Rezeptor des Nitratreduktasesystems in der Zelle ist noch fast nichts bekannt (vgl. Spence 1969). Ein Rückschluss aus den vorliegenden Versuchsergebnissen auf eine direkte Wirkung von Mo^{III} ist daher kaum zulässig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Einfluss des Oxydationszustandes des Molybdäns in der gewählten Versuchsanordnung nur indirekt, nämlich insofern als die Oxydationszahl des Molybdäns die Stabilität der angebotenen Mo-EDTA Komplexe bestimmt, zum Ausdruck kommt.

Zusammenfassung

(1) Bei der Untersuchung des Wachstums von *Aspergillus niger* in Abhängigkeit von verschiedenen Molybdänverbindungen in der Nährlösung, erwies sich ein tiefer pH-Wert der ungepufferten Nährlösung von pH 2.0–2.5 als geeignet.

(2) Eine Pufferung der Nährlösung durch prim. Natriumphosphat, Tartrat und Citrat (0.1 Molar) bewirkt keine grossere pH-Konstanz während des Versuchs, sondern wirkt sich durch direkte Beeinflussung des Versuchsorganismus durch diese Puffersubstanzen ungünstig aus.

(3) Molybdat, in optimaler Konzentration von 0.01 μg Mo / 50 ml Nährlösung (2.10^{-9} Molar), das bei pH 2.5 in der Lösung als voluminöses Polysäureanion mit hoher negativer Ladung vorliegt, ergibt nach dem dritten Tag einen steilen Wachstumsanstieg. Das Myceltrockengewicht erreicht nach sieben bis acht Tagen ein Maximum, woran sich fast unmittelbar ein Wachstumsrückgang unter Autolyse des Mycels anschliesst.

(4) Eine molybdänfreie Lösung zeigt bis zum achten Tage, gemessen am vollen Wachstum, eine Gewichtszunahme von nur 4%. Es gelingt offenbar mit der angewandten Methode zur Reinigung der Nährlösung und der Glasgeräte, nahezu die letzten Spuren von Molybdän aus der Nährlösung zu entfernen. Es ist somit in der eigenen Versuchsanordnung wiederum gezeigt, dass Molybdän für das Wachstum von *Aspergillus niger* essentiell ist, und dass von den übrigen gebotenen Spurenelementen (Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Ni) offenbar keines die Rolle von Molybdän übernehmen kann.

(5) Ein Überschuss an EDTA (Aethylendiamintetraessigsäure) ergibt eine vollständige Wachstumshemmung, die auf eine relativ stabile Komplexierung einiger in der Nährlösung befindlicher Spurenelemente, offenbar vor allem Eisen und Kupfer, zurückgeführt werden muss. Eine Erhöhung der Schwermetallkonzentration auf den 10-fachen Wert genügt, um die Wachstumshemmung aufzuheben, obwohl der Quotient [M]/[EDTA] weit unter 1 bleibt.

(6) Bei der Zugabe von Mo^{VI}-EDTA ergibt sich ungefähr derselbe Wachstumsverlauf, wie bei Verwendung von Polymolybdat als Molybdänquelle. Dieses Ergebnis kann durch die geringe Stabilität des Mo^{VI}-EDTA Komplexes erklärt werden, die zur Folge hat, dass dieser Komplex unter den herrschenden Versuchsbedingungen weitgehend dissoziiert vorliegt.

(7) Bei der Verwendung von Mo^{V}-EDTA als Molybdänquelle ist nur sehr verzögertes und geringes Wachstum zu beobachten. Es dürfte dieses Ergebnis auf die sehr grosse Stabilität des Mo^{V}-EDTA Chelates zurückzuführen sein.

(8) Die Wachstumsrate, hervorgerufen durch Mo^{III}-EDTA liegt ungefähr in der Mitte zwischen den Wachstumsraten der andern beiden Molybdänchelate. Die Tatsache, dass Mo^{III}-EDTA in luftgesättigter Lösung langsam zum unwirksamen Mo^{V}-EDTA oxydiert wird, erklärt einerseits das geringe Wachstum in Mo^{III}-EDTA enthaltenden Lösungen. Als Erklärung der beschränkten positiven Wirkung des recht stabilen Mo^{III}-EDTA Komplexes bieten sich verschiedene Hypothesen an, von denen aber keine als gesichert betrachtet werden kann, da eine mögliche Rolle des Mo^{III} im Mechanismus der Nitratreduktion bisher nicht bewiesen ist.

(9) Die Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Molybdänkonzentration sind im kritischen Konzentrationsbereich S-förmig. Es konnte gezeigt werden, dass eine solche Form der Funktion $W = f([Mo]_Z)$, wobei W das Wachstum und $[Mo]_Z$ die Molybdänkonzentration in der Lösung bedeutet, auf eine echte Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums im Sinne einer chemischen Massenwirkung hinweist.

(10) Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Versuchsergebnissen geschlossen werden, dass die Zellmembran von *Aspergillus niger* offenbar nicht in der Lage ist, die voluminösen, stark negativ gelanenen Mo-EDTA Chelate aufzunehmen, und das der Oxydationszustand des Molybdäns in der Lösung nur mittelbar, über die Beeinflussung der Komplexstabilität von Bedeutung ist.

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Leitung von Herrn *Prof. Dr. M. Geiger-Huber,* und in Zusammenarbeit mit Herrn *Prof. Dr. S. Fallab* ausgeführt. Herrn *Prof. Dr. M. Geiger-Huber* danke ich für sein wohlwollendes Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er mir die Mittel des Institutes in sehr grosszügiger Weise zur Verfügung gestellt hat. Herrn *Prof. Dr. S. Fallab* bin ich zu grossem Dank verpflichtet für die Herstellung und Prüfung der in dieser Arbeit verwendeten Molybdän-EDTA Verbindungen, vor allem aber auch für seine umfassende Beratung, das chemische Verhalten dieser Substanzen unter den gewählten Versuchsbedingungen betreffend. Seine Angaben mussten bei der Beurteilung der Resultate entscheidend berücksichtigt werden.

Herr *J. Graf* hat die Konstruktionspläne verschiedener, spezieller Apparaturen ausgeführt, und Herr *J. Beke* hat deren Bau übernommen. Ihnen beiden, sowie Herrn *W. Flückiger,* der einige der Vorversuche durchgeführt hat, möchte ich an dieser Stelle bestens danken.

Literatur

Ainsworth G.C., Sussman A.S. 1965. The Fungi, *1,* 349–376, Academic Press London.

Albert A., Serjeant E.P. 1962. Ionization Constants, Methuen London.

Aleem M.I.H., 1970. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds, Ann. Rev. Plant Physiology *21,* 67–90.

Arnon D.I., 1950. Criteria of Essentiality of Inorganic Micronutrients for plants. With special Reference to Molybdenum. Lotsya, *3,* 31–38.

Arnon D.I., Wessel G., 1953. Vanadium as an essential Element for Green Plants. Nature *172,* 1039–1040.

Arnon D.I. et al. 1955. Molybdenum in Relation to Nitrogen Metabolism. 1. Assimilation of Nitrate Nitrogen by *Scenedesmus.* Physiol. Plantarum *8,* 538–551.

Bortels H. 1930. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. Archiv f. Mikrobiologie *1,* 333–342.

Burström H. 1961. Growth Action of EDTA in Light and Darkness. Physiologia Plantarum *14,* 354–377.

Burström H. 1963. Growth Regulation by Metals and Chelates. Adv. in Bot. Research *1,* 73–100.

Bussler W. 1970. Nachweis von Molybdän in einem Tropfen Nährlösung durch Molybdänmangelsymptome bei *Aspergillus niger.* Zeitschr. für Pflanzenernährung und Bodenkunde, *125,* 16–23.

Chaberek S., Martell A. 1959, Organic Sequestering Agents. John Wiley New York.
Cochrane V.W. 1966. Physiology of Fungi, Wiley Toppan New York. Tokyo.
Cotton F.A., Wilkinson G. 1962. Advanced Inorganic Chemistry, Intersience Publishers.
Cove D.J. 1967. Kinetic Studies of the Induction of Nitrate Reductase and Cytochrome c Reductase in the Fungus *Aspergillus nidulans.* Biochem. J. *104,* 1033–1039.
Fogg G.E., Wolfe M. 1954. The Nitrogen Metabolism of the Blue-green Algae (Myxophyceae). Symp. Soc. for General Mycrobiology, 99–125, Cambridge.
Foster J.W. 1949. Chemical Activities of Fungi. Acad Press New York.
Hawker L.E. 1950. Physiology of Fungi. University of London Press, London.
Hawker L.E. 1957. The Physiology of Reproduction in Fungi. Cambridge Univ. Press.
Hewitt E.J., Hallas D.G. 1951. The use of *Aspergillus niger* V. Tiegh. M-Strain as a test organism in the study of Molybdenum as a plant nutrient. Plant and Soil *4,* 366–408.
Hewitt E.J. et al. 1954. The production of copper, zinc and molybdenum deficiencies in crop plants grown in sand culture with special reference to some effects of water supply and seed reserves. Plant and Soil *5,* 205–222.
Hewitt E. J. 1959. The metabolism of Micronutrient Elements in Plants. Biol. Rev. of the Cambridge Phil. Soc. *34,* 333–377.
Hewitt E.J. 1966. Sand and Water culture methods used in the Study of Plant nutrition. Comm. Agr. Bureaux, England.
Hewitt E.J., Cutting C.V. 1968. Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants. Proc. Symp. Long Ashton, Bristol Academic Press, London.
Hill-Cottingham D.G., Lloyd-Jones C.P. 1965. The Behaviour of Iron Chelating Agents with Plants. J. of Experimental Botany *16,* 233–242.
Hoover W.L., Duren S. 1967. Determination of Molybdenum in Fertilizers by Atomic Absorption Spectrophotometry. Journal of the A.O.A.C. *50,* 1269–1273.
Hutner S.H., Provasoli L. 1964. Nutrition of Algae. Ann. Rev. of Plant Physiology *15,* 37–56.
Kessler E. 1964. Nitrate Assimilation by Plants. Ann. Rev. of Plant Physiology *15,* 57–72.
Koch O.G., Koch-Dedic G.A. 1964. Handbuch der Spurenanalyse Springer, Berlin.
Lavollay J. 1950. Sur l'Activité et l'Interdependance des Aliments dans la Nutrition d'*Aspergillus niger.* Lotsya *3,* 107–118.
Lilly V.G., Barnett H.L. 1951. Physiology of the Fungi, New York.
Linder A. 1969. Planen und Auswerten von Versuchen. Basel.
Maheshwari S.C., Seth P.N. 1966. Induction of flowering in *Wolffia microscopica* by the Iron salt of EDDHA. Zeitschr. für Pflanzenphysiol. *55,* 89–91.
Mulder E.G. 1939. On the use of Micro-Organisms in measuring a deficiency of Copper, Manganese and Molybdenum in soils. Antonie van Leeuwenhoek *6,* 99–109.
Mulder E.G. 1950. Importance of Copper and Molybdenum in the Nutrition of Higher Plants and Microorganisms. Lotsya *3,* 41–50.
Nicholas D.J.D., Fielding A.H. 1950–1951. The use of *Aspergillus niger* (M) for the Determination of Mg, Zn, Cu, Mo available in soils to Crop plants. The Journal of Horticultural Science *26,* 125–147.
Nicholas D.J.D. 1952. The Use of Fungi for Determining Trace Metals in Biological Materials. The Analyst *77,* 629–641.
Nicholas D.J.D., Stevens H.M. 1955. Valency changes of Molybdenum during the Enzymatic reduction of Nitrate in *Neurospora.* Nature *176,* 1066–1067.
Paech K., Tracey M.V. 1956, 1964. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. *I, VII* Springer, Berlin.
Palmer W.G. 1964. Experimental Inorganic Chemistry. University Press Cambridge.
Pecsok R.L., Sawler D.T. 1956. Molybdenum (V) and Molybdenum (VI) Complexes with Ethylendediamintetraacetic Acid. J. American Chem. Soc. *78,* 5496–5500.
Peter M. 1956. Beiträge zum Problem der Aufnahme und Assimilation von Nitrat durch *Aspergillus niger.* Ber. Schweiz. Bot. Ges. *66,* 277–317.
Reese E.T., Maguire A. 1969. Surfactants as stimulants of Enzyme Production by Microorganisms. Applied Microbiology *17,* 242–245.

Sahni V.P. 1967. Nitrite Assimilation at different pH levels by three imperfect Fungi. Current Science *36*, 437–438.
Sajo I. 1957. Der Komplex des fünfwertigen Vanadiums mit Aethylendiamin-Tetraessigsäure. Acta Chimica Hungarica *16*, 115–129.
Sarasin A. 1953. Untersuchungen über Lactoflavinbildung durch *Aspergillus niger v. Tiegh.* Ber. Schweiz. Bot. Ges. *63*, 287–316.
Schlee D. et al. 1970. Purinstoffwechsel und Riboflavinüberproduktion bei Mikroorganismen. 3. Mitteilung Biochem. Physiol. Pflanzen *161*, 459–468.
Schwarzenbach G. 1960. Die komplexometrische Titration. Enke Stuttgart.
Spence J.T. 1969. Biochemical Aspects of Molybdenum Coordination Chemistry. Coordination Chem. Rev. *4*, 475–498.
Stability Constants of Metal Ion Complexes. 1964. Hrs. The Chemical Society, London.
Steinberg R.A. 1955. Nutrient-Solution purification for removal of heavy Metals in deficiency investigations with *Aspergillus niger.* Journal of Agr. Research *51*, 413–424.
Steinberg R.A. 1950. Growth of Fungi in Synthetic Nutrient Solutions II. Bot. Rev. *16*, 208.
Steward F.C. 1963. Plant Physiology. Bd. III, Academic Press, London, New York.
Stewart I. 1963. Chelation in the Absorption and Translocation of Mineral Elements. Ann. Rev. Plant Physiol. *14*, 295–310.
Stout P.R., Arnon D.I. 1939. Experimental Methods for the study of the role of copper, manganese and zink in the nutrition of higher plants. Am. J. of Botany *26*, 144–149.
Stout P.R., Meagher W.R. 1948. Studies of the Molybdenum Nutrition of Plants with Radioactive Molybdemum. Science *108*, 471–473.
Tiffin Lee O., Brown J.C. 1961. Selective Absorption of Iron Chelates by Soybean Plants. Plant Physiology *36*, 710–714.
Vöchting A. 1953. Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays L.* und *Aspergillus niger v. Tiegh.* in Einzelkultur und in Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. *63*, 103–161.
Wallace A. 1962. A Decade of Sythetic Chelating Agents in Inorganic Plant Nutrition. Los Angeles.
Wallace A. 1966. Current Topics in Plant Nutrition. Los Angeles.
Wallace W., Nicholas D.J.D. 1968. Properties of some Reductase Enzymes in the Nitrifying Bacteria and their Relationship to the Oxidase Systems. Biochem. J. *109*, 763–773.
Wallace W., Nicholas D.J.D. 1969. The Biochemistry of nitrifying Microorganisms. Biol. Rev. *44*, 359–391.
Wallace W., Nicholas D.J.D. 1969. Glutamate Dehydrogenase in *Nitrosomonas Europaea* and the effect of Hydroxylamine, Oxims and related Compounds on its activity. Biochim. Biophys. Acta *171*, 229–237.
Weinstein L.H. et al. 1956. Growth promoting Effects of EDTA. Nature *178*, 1188.
Weinstein L.H. et al. 1954–1957. Effect of EDTA on Nitrogen Metabolism and Enzyme Patterns in Soybean Plants. Contrib. of Boyce Thompson Inst. *18*, 357–370.
Williams R.J.P. 1967. Les Métaux lourds dans les systèmes biologiques. Endeavour *98*, 96–100.

Lucia Graf
Steinengraben 65
4051 Basel

Curriculum vitae

Am 26. Juni 1938 wurde ich, Lucia Silvia Graf, von Zürich und Basel, als Tochter des Jakob Ulrich Graf, Ingenieur, und der Martha Graf geb. Hatt, in Zürich geboren.

Seit 1941 ist meine Familie in Basel wohnhaft. Hier besuchte ich von 1945–1949 die Primarschule und anschliessend das Mädchengymnasium, dessen Realabteilung ich durchlief und mit der kantonalen Maturitätsprüfung abschloss. Vom Frühjahr 1957–1959 absolvierte ich eine Laborantinnenlehre am Institut für Anorganische Chemie an der Universität Basel, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer. Nachdem ich, im Anschluss an meine Lehre, während eines Jahres an diesem Institut unter Herrn Prof. Dr. S. Fallab als Laborantin tätig gewesen war, immatrikulierte ich mich im Frühjahr 1960 an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. Ich widmete mich dem Studium der Botanik, Chemie, Zoologie, Med. Mikrobiologie, sowie der Physik und der Physikalischen Chemie. In Chemie, Zoologie und Med. Mikrobiologie legte ich Nebenfachprüfungen ab.

Während den Jahren 1964–1969 war ich Assistentin am Botanischen Institut der Universität Basel. Im Winter 1968/69 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber, die vorliegende Dissertation auszuarbeiten.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Dozenten: M. Brenner, P. Buchner, H. Erlenmeyer †, M. Geiger-Huber, R. Geigy, C. Grob, P. Huber †, L. Jenny, W. Kuhn †, A. Läuchli, P. Leepin, H. Nüesch, A. Portmann, H. Salmony, R. Schenkel, P. Schmid, Ch. Tamm, M. Thürkauf, J. Tomcsik †, W. Vischer †, H. Zoller.

Allen meinen Lehrern möchte ich an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.